



FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y  
FARMACÉUTICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO



CENTRO DE ESTUDIOS FOTOSINTÉTICOS Y BIOQUÍMICOS

TESIS DE DOCTORADO

“APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LOS MÓDULOS  
DE UNIÓN A CARBOHIDRATOS DE PLANTAS”

Presentada por Mauricio Javier Grisolia

Rosario, Argentina

2016

# “Aplicaciones biotecnológicas de los módulos de unión a carbohidratos de plantas”

Mauricio Javier Grisolia

Licenciado en Biotecnología

Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos, del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CEFOBI-CONICET), dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 4 de abril del 2010 y el 31 de Marzo del 2016, bajo la dirección de la Dra. María Victoria Busi, y la co-dirección del Dr. Diego F. Gómez Casati.

Nombres y firmas del Director y de los integrantes del Jurado de Tesis:

Dra. María Victoria Busi

Dr. Diego F. Gómez Casati

Dr. Néstor J. Carrillo

Dr. José M. Estévez

Dr. Pedro M. Chivello

Defendida: Diciembre del 2016

# Publicaciones

Parte de estos resultados han sido volcados en las siguientes publicaciones:

- HA Valdez, DA Peralta, NZ Wayllace, MJ Grisolia, DF Gomez-Casati and MV Busi. (2010) *SBD of Arabidopsis thaliana SSIII binds preferentially to amylose than amylopectin: study of the amino acid residues involved in binding sites 1 and 2*. **Starch – Stärke**, 63:451-460.
- MJ Grisolia, DA Peralta, HA Valdez, J Barchiesi, DF Gomez-Casati and MV Busi (2016) *The targeting of starch binding domains from starch synthase III to the cell wall alters cell wall composition and properties*. **Plant Mol Biol**, 1–15. DOI **10.1007/s11103-016-0551-y**
- MJ Grisolia, DA Peralta, DF Gomez-Casati and MV Busi (2016) *Transcript profiling of transgenic Arabidopsis thaliana plants displaying an alteration in cell wall properties*. **Mol Plant - Enviado**
- MJ Grisolia, Julieta Barchiesi, Valeria E. Perotti, Diego F. Gomez-Casati and Maria V. Busi (2016). *Cell wall–expressed SBD affects carbon partitioning between reserve and structural polysaccharides in Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology. Enviado.**

# Publicaciones en Congresos

## Congresos Nacionales

- XXVIII Reunión de la Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal 2010. La Plata, Argentina. 2010. *Arabidopsis thaliana* vegetal cell wall modification.
- XLVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular SAIB 2010. Puerto Madryn, Argentina. 2010. *Structural Alteration of plant cell wall in transgenic Arabidopsis thaliana*.
- XLVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular SAIB 2011. Potrero de los Funes, Argentina. 2011. *Cell wall destructureation alters starch and sucrose metabolism*.
- V Jornadas de ciencia y tecnología – UNR. Rosario, Argentina. 2011. *Biocombustibles: Aplicaciones Biotecnológicas de los Módulos de unión a carbohidratos de Plantas*
- 1er Encuentro Regional de Investigadores en el área de Biocombustibles de 2da generación (INTA – Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca- Presidencia de la Nación – Embrapa Agroingeniería). CABA, Argentina. 2012. *Utilización de módulos de unión a carbohidratos de plantas en la obtención de mejores sustratos para la producción de biocombustibles*
- 3º Congreso Nacional de Agrobiotecnología, propiedad intelectual y políticas públicas. Rosario, Argentina. 2012. *Biocombustibles: Aplicaciones Biotecnológicas de los módulos de unión a carbohidratos de plantas*
- 1er Encuentro Tecnológico sobre Biocombustibles (Entec-CONICET-CCT ROSARIO). Rosario, Argentina. 2012. *Estrategias biotecnológicas para la producción de Bioetanol*
- II Jornada Regional de Ciencia y Tecnología, UNR – Fundación. Rosario, Argentina 2012. *Estrategias biotecnológicas para la producción de bioetanol*

## Congresos Internacionales

- 3rd Latin American Protein Society Meeting 2010. Salta, Argentina 2010. Homology modeling of the three AtXyn1 CBMs from *Arabidopsis thaliana* using the CBM 22 modules from a xylanase of *Clostridium thermocellum*.
- III Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología. Mar del Plata, Argentina, 2013. “Cellular expansion: More than a game of forces”

# *Agradecimientos*

En primer lugar quisiera agradecerle a Dios, por estar junto a mi familia y por enseñarme a dejar fluir todos los aspectos de mi vida. También agradezco profundamente a mi directora, Victoria. Gracias por confiar en mi capacidad y en fomentar la libertad de pensamiento en todo el grupo de trabajo. También quiero agradecer a mi co-director Diego. Gracias por permitirme crecer y confiar en mis opiniones.

Agradezco profundamente a todos mis compañeros del CEFOBI, los viejos y los nuevos. Gracias por esos almuerzos llenos de risas. Conocí personas maravillosas a las que me enorgullezco de llamar amigos.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio, Diego, Vale, Cele, Coca, Nico, Laura, Juli B, Juli C, Marian, Ale, Manu, Dalmacio, Junior, Luisi, Agus, Flor y Ayelén. Gracias por hacerme sentir como en casa, y por ayudarme en los buenos momentos y en los no tan buenos.

Quisiera agradecer a mis amigos de toda la vida, por estar cerca de mí y de mi familia.

Me gustaría agradecer a mi familia. A mi papá Buló, a mi vieja Marta y a mi hermana Cuca. Agradezco a Dios por la familia que me dio.

Por último quisiera agradecer a las dos personas que más amo en este mundo, a mi mujer Milagros, y al ser más maravilloso de este mundo, Rosario. Gracias por hacerme Papá. Ustedes son la luz de mi vida. Este logro es de nosotros tres.

A los que ya no están.

# ÍNDICE

---

<b>Publicaciones.....</b>	<b>4</b>
<b>Publicaciones en Congresos .....</b>	<b>5</b>
Congresos Nacionales.....	5
Congresos Internacionales .....	5
<b>Agradecimientos .....</b>	<b>6</b>
<b>ÍNDICE.....</b>	<b>7</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS .....</b>	<b>15</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>20</b>
<b>ANGLICISMOS .....</b>	<b>24</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>26</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>30</b>
Clasificación de los CBM .....	32
Nomenclatura de los CBM .....	32
Familias de plegamientos .....	33
Familia de plegamiento 1: Sándwich $\beta$ .....	34
Familia de plegamiento 2: Trébol $\beta$ .....	35
Familia de plegamiento 3: Nudo de cisteína .....	35
Familia de plegamiento 4: Único.....	36

Familia de plegamiento 5: Plegamiento OB .....	36
Familia de plegamiento 6: Plegamiento “heveína” .....	36
Familia de plegamiento 7: Único con plegamiento tipo “heveína”) .....	36
Relación entre estructura y función: Tipos de CBM.....	37
Función de los CBM .....	38
Fuerza motriz en la interacción CBM-carbohidrato. ....	39
Promiscuidad y multivalencia de los CBM. ....	41
Dominios de unión a almidón (SBD) .....	42
El almidón y su biosíntesis .....	42
La almidón sintasa III de <i>Arabidopsis thaliana</i> . ....	43
Aplicaciones biotecnológicas de los CBM .....	44
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>45</b>
Material Biológico: .....	46
Cultivares de <i>A. thaliana</i> .....	46
Cepas de células utilizadas .....	46
Medios de cultivo:.....	46
Soluciones Buffer:.....	47
Antibióticos y otros compuestos relacionados: .....	47
Oligonucleótidos utilizados:.....	47
Detalle de técnicas: .....	48
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	48

Electroforesis de ADN en geles de agarosa .....	49
Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa .....	49
Clonado de fragmentos de ADN con extremos cohesivos .....	49
Clonado en vector de expresión .....	49
Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> .....	51
Transformación de células de <i>E. coli</i> .....	51
Análisis de transformantes por PCR de colonia.....	51
Obtención de ADN plasmídico a mini escala .....	51
Reacciones de restricción con endonucleasas .....	52
Expresión y purificación de proteínas recombinantes .....	52
Cuantificación de proteínas .....	53
Electroforesis y detección inmunológica .....	54
Ensayos de unión de las proteínas recombinantes a distintos sustratos .....	54
Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> por “Floral Dip” .....	54
Esterilización y siembra de semillas .....	55
Clonado de fragmentos de ADN a través de tecnología Gateway .....	56
Obtención de ADN genómico de plantas.....	56
Extracción de ARN .....	56
Reacción de retro-transcripción .....	57
Selección de plantas transformantes E8-SBD123.....	57
Ensayos de unión a polisacáridos .....	58
qRT-PCR análisis .....	58



Análisis de la expansión de la roseta. ....	63
Análisis fenotípico del crecimiento .....	63
Determinación de intercambio gaseoso .....	64
Observaciones por microscopía .....	64
Determinación del contenido de componentes de pared celular .....	64
Determinación de pectinas, hemicelulosas y ligninas .....	65
Hidrólisis de pared celular y obtención de perfiles metabólicos.....	65
Obtención de protoplastos .....	66
Digestibilidad de materia seca in vitro.....	66
Determinación enzimática del contenido de almidón .....	67
Determinación de la relación amilosa-amilopectina .....	67
Ensayos de actividad enzimática .....	68
Actividad almidón sintasa.....	68
Extracción de proteínas para electroforesis en dos dimensiones .....	68
Electroforesis diferencial en dos dimensiones (2D-DIGE).....	69
Marcado de las proteínas mediante fluoróforos .....	70
Primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF) .....	70
Segunda dimensión: SDS-PAGE.....	70
Análisis de los geles bidimensionales .....	71
Escisión de los polipéptidos de expresión diferencial de geles 2D. Espectrometría de masa (MALDI-TOF-TOF) .....	72
Alineamiento de secuencias aminoacídicas .....	73

Construcción de base de datos de secuencias de CBM de la familia 22 .....	73
Alineamiento múltiple .....	73
Construcción de árboles filogenéticos .....	73
Modelado de estructura 3D.....	74
Estudios de acoplamientos.....	74
Curvas de desnaturalización .....	74
Preparación de soluciones de polisacáridos stock.....	75
Medidas espectrofluorométricas .....	75
Medidas de dicroísmo circular.....	75
Análisis Estadístico.....	76
<b>I. CAPÍTULO 1: .....</b>	<b>77</b>
<b>Caracterización de plantas E8-SBD123.....</b>	<b>77</b>
Introducción: .....	78
Resultados: .....	79
SBD123 se une preferencialmente a los polisacáridos de pared celular .....	79
SBD123 es dirigido a la pared celular de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	81
Caracterización fenotípica de las plantas transgénicas .....	83
Las plantas E8-SBD123 presentan mayor tamaño que las silvestres .....	83
La expansión celular impulsa la producción de biomasa.....	89
Los componentes de la pared celular se encuentran alterados en las plantas transgénicas.....	90
Respuesta transcripcional de los genes involucrados en la síntesis y degradación de celulosa y hemicelulosas.....	93

Las plantas transgénicas son más susceptibles a la digestión que las plantas Col-0. ....	99
Los niveles de azúcar fermentables aumentan como consecuencia del incremento de la biomasa .	100
Discusión: .....	101
<b>II. CAPÍTULO 2: .....</b>	<b>105</b>
<b>Caracterización de la partición de carbono entre polisacáridos de reserva y estructurales en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> E8-SBD123. ....</b>	<b>105</b>
Introducción: .....	106
Resultados: .....	107
El contenido y la composición del almidón se encuentran alterados en las líneas transgénicas. ....	107
Contenido de Almidón.....	107
Caracterización microscópica de los gránulos de almidón .....	108
Contenido de Almidón Resistente .....	109
Respuesta transcripcional los genes asociados al metabolismo de almidón en <i>A. thaliana</i> E8-SBD123 y actividad almidón sintasa total .....	111
Perfil de metabolitos de hojas .....	112
El metabolismo central del carbono no aparenta influir en la partición de carbono entre los distintos polisacáridos de las plantas transgénicas. ....	114
Respuesta transcripcional de los genes asociados al metabolismo de carbono en <i>A. thaliana</i> y su correlato en actividades enzimáticas.....	114
El metabolismo de la sacarosa juega un rol crítico en la partición de carbono de las líneas transgénicas. ....	116
Actividad enzimática de enzimas asociadas al metabolismo de la sacarosa.....	118
Contenido de clorofila y tasa de intercambio de CO <sub>2</sub> en las líneas E8-SBD123 .....	119
Análisis a nivel proteoma por técnicas de electroforesis de proteínas en dos dimensiones (DIGE) .....	119

Discusión: .....	121
<b>III. CAPÍTULO 3:.....</b>	<b>127</b>
<b>Estudio de los CBM N-terminales de la ATXYN1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>.....</b>	<b>127</b>
Introducción: .....	128
Resultados: .....	132
Análisis bioinformático, evolutivo y modelado de la estructura tridimensional de los CMB de ATXYN1.....	132
Alineamientos de secuencias: .....	132
Alineamiento múltiple en la familia 22 .....	135
Inferencias Filogenéticas a partir de los alineamientos Múltiples de la Familia CAZy 22.....	136
Modelado por homología basado en alineamiento estructural.....	139
Enhebrado molecular .....	139
Refinamiento del Modelo .....	140
Posiciones de los residuos involucrados en la unión a polisacáridos.....	142
Análisis de unión de ligando por acoplamiento ("Molecular Docking") .....	144
Clonado del extremo N-terminal de ATXYN1 de forma entera y parcial en un vector adecuado para su expresión heteróloga en <i>E. coli</i> . .....	146
Purificación de las proteínas recombinantes empleando matrices de Ni <sup>2+</sup> .....	147
Evaluación de propiedades bioquímicas y espectrofotométrica del dominio Xyl1 .....	149
Evaluación del espectro de Dicroísmo Circular de XYL1 en presencia y ausencia de distintos ligandos.....	149
Estimación de la temperatura de desnaturalización de XYL1 .....	151

Estudios espectrofluorométricos del dominio XYL1 en ausencia y en presencia de distintos ligandos .....	152
Evaluación de propiedades bioquímicas y espectrofotométrica del dominio XYL2 .....	156
Evaluación del espectro de Dicroísmo Circular de XYL2 en presencia y ausencia de distintos ligandos.....	156
Estimación de la temperatura de desnaturalización de XYL2 .....	157
Estudios espectrofluorométricos del dominio XYL2 en ausencia y en presencia de distintos ligandos .....	157
Evaluación de propiedades bioquímicas y espectrofotométrica del dominio XYL3 .....	160
Evaluación del espectro de Dicroísmo Circular de XYL3 en presencia y ausencia de distintos ligandos.....	160
Estimación de la temperatura de desnaturalización y estudios espectrofluorométricos del dominio XYL3 en ausencia y en presencia de distintos ligandos .....	161
Efecto in trans de los dominios XYL1, XYL2 y XYL3 sobre la actividad xilanasa de una enzima comercial .....	164
Discusión: .....	167
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>171</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>173</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>204</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>207</b>
Script de Perl utilizado para la obtención de las secuencias primarias de los CBM de todas las familias CAZy. ....	208

# ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

---

Figura A-1: Histograma de frecuencias de las estructuras tridimensionales de módulos de unión a carbohidratos discriminado por familia. ....	33
Figura A-2 Familias de plegamiento de los CBM (representados como cintas).....	34
Figura A-3 Clasificación de los CBM según la región de unión al sustrato. ....	37
Figura A-4 Plataformas de unión formada por los residuos aromáticos.....	40
Figura A-5 Reacciones de síntesis del almidón en plantas.....	42
Tabla B-1 Antibióticos y otros compuestos utilizados.....	47
Tabla B-2 Oligonucleótidos.....	48
Tabla B-3 Protocolo de ligación con extremos cohesivos.....	49
Tabla B-4 Protocolo de restricción con endonucleasas .....	52
Tabla B-5 Protocolo para la reacción de retrotranscripción.....	57
Tabla B-6 Oligonucleótidos utilizados para PCR en tiempo real. ....	63
Figura I-1 SBD123 se une in vitro al almidón y a polisacáridos de la pared celular.....	80
Figura I-2 Expresión relativa del transgen E8-SBD123 transgen obtenida mediante qPCR en Tiempo Real. ....	81
Figura I-3 Localización subcelular de SBD123 en líneas de <i>A. thaliana</i> Col-0 y E8-SBD123.....	82
Figura I-4 Fenotipo de crecimiento de plantas Col-0 y E8-SBD123.....	83
Figura I-5 Fenotipo de crecimiento de plantas Col-0 y E8-SBD123.....	84
Tabla I-1 Parámetros de crecimiento vegetativo de líneas Col-0 y E8-SBD123.....	86
Tabla I-2 Parámetros de crecimiento reproductivo en plantas Col-0 y E8-SBD123. ....	87
Figura I-6 Determinación del tiempo de floración de plantas Col-0 y E8-SBD123. ....	88
Figura I-7 Observación microscópica de células sub-epidérmicas de <i>A. thaliana</i> .....	89

Tabla I-3 Área celular promedio en hoja y tallo de líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 y E8-SDB123. .....	90
Figura I-8 Microscopía de transmisión electrónica de paredes celulares de <i>Arabidopsis thaliana</i> . .....	91
Figura I-9 Composición de la pared celular de las líneas Col-0, E8-SBD123.1 y E8-SBD123.2. ....	92
Figura I-10 Perfiles de expresión de los genes involucrados en el metabolismo de pared celular primaria. ....	94
Figura I-11 Perfiles de expresión de los genes que codifican isoformas del tipo CESA6. ....	95
Figura I-12 Perfiles de expresión de los genes que codifican enzimas de remodelación de la pared celular.....	95
Figura I-13 Perfiles de expresión de los genes que codifican enzimas de síntesis de pared secundaria. ....	97
Figura I-14 Perfiles de expresión de los genes que codifican para receptores asociados a pared celular.....	99
Figura I-15 Contenido de azúcar fermentable determinado enzimáticamente.....	100
Figura II-1 Caracterización del almidón de plantas E8-SBD123.....	107
Figura II-2 Evaluación de tejidos maduros de plantas de <i>A. thaliana</i> . ....	108
Figura II-3 Comparación de los tamaños de los gránulos de almidón. ....	109
Figura II-4 Caracterización del metabolismo de almidón en hojas de líneas Col-0 (negro), E8- SBD123.1 (gris claro) y E8-SBD123.2 (gris oscuro).....	110
Figura II-5 SDS-PAGE de extractos proteicos totales de hojas de <i>A. thaliana</i> . ....	111
Figura II-6 Perfil metabólico de un extracto total de hojas de <i>A. thaliana</i> . ....	113
Figura II-7 Niveles de expresión de genes que codifican enzimas involucradas en el metabolismo de carbono. ....	115
Figura II-8 Caracterización se la síntesis y degradación de sacarosa.....	117



Tabla II-1 Parámetros fotosintéticos en hojas de <i>A. thaliana</i> .....	119
Figura II-9 Electroforesis en 2-D gel de extracto de proteínas totales de hojas de <i>A. thaliana</i> . ....	120
Figura III-1 Esquema de la secuencia consenso del sitio activo de las GH10. ....	128
Figura III-2 Mecanismo de retención para una $\beta$ -glucosidasa del tipo GH10. ....	129
Figura III-3 Esquema de las xilanasas GH10 de <i>A. thaliana</i> .....	130
Figura III-4 Ilustración de la estructura del CBM6 de <i>Cellvibrio mixtus</i> .....	131
Tabla III-1 Resumen de la salida del DELTA-BLAST.....	133
Tabla III-2 Resumen de la salida del DELTA-BLAST (PDB). ....	134
Tabla III-3 Comparación de los porcentajes de identidad y similitud entre los dominios XYL de ATXYN1. ....	135
Figura III-5 Estudio evolutivo de las secuencias aminoacídicas de los dominios XYL de ATXYN1. ....	137
Tabla III-4 Descripción de los modelos obtenidos luego del refinamiento estructural. ....	140
Tabla III-5 Descripción de los modelos obtenidos por enhebrado molecular. ....	140
Figura III-6 Ilustración de los modelos de los dominios XYL de ATXYN1.....	141
Figura III-7 Identificación de los residuos involucrados en la unión a sustrato por homología.....	143
Tabla III-6 Valores de energía de interacción.....	144
Figura III-8 Distancias entre los residuos del sitio de unión de XYL2 y la xilotetraosa.....	145
Figura III-9 Esquema del clonado del extremo N-terminal de ATXYN1.....	147
Figura III-10 Detección por inmunotransferencia de los dominios CBM de ATXYN1. ....	148
Figura III-11 Purificación por afinidad de los dominios CBM individuales de ATXYN1. ....	149
Figura III-12 Espectros de Dicroísmo Circular de XYL1. ....	150

Tabla III-7 Porcentaje de estructura secundaria obtenida para el dominio XYL1.....	151
Figura III-13 Curva de desnaturalización de XYL1 en función de la temperatura. ....	152
Figura III-14 Estudios Espectrofluorométricos del dominio XYL1 de ATXYN1 de <i>A. thaliana</i> ..	154
Figura III-15 Espectros de Dicroísmo Circular de XYL2.....	156
Tabla III-8 Porcentaje de estructura secundaria obtenida para el dominio XYL2.....	157
Figura III-16 Curva de desnaturalización de AtXYL2 en función de la temperatura.....	158
Figura III-17 Estudios Espectrofluorométricos del dominio XYL2 de ATXYN1 de <i>A. thaliana</i> ..	159
Figura III-18 Espectros de Dicroísmo Circular de XYL3.....	161
Tabla III-9 Porcentaje de estructura secundaria obtenida para el dominio XYL3.....	161
Figura III-19 Curva de desnaturalización de XYL3 en función de la temperatura. ....	162
Figura III-20 Estudios Espectrofluorométricos del dominio XYL3 de ATXYN1 de <i>A. thaliana</i> ..	163
Figura III-21 Actividad de la xilanasa XYNA de <i>Thermomyces lanuginosus</i> .....	165
Figura III-22 Evaluación de los parámetros cinéticos de la xilanasa XYNA de <i>Thermomyces lanuginosus</i> .....	166
Tabla Anexo 1 Detalle de los genes involucrados en el metabolismo de la pared celular.....	205
Tabla Anexo 2 Detalle de los genes involucrados en el metabolismo de almidón y sacarosa.....	206

# ABREVIATURAS

---

°C	Grados Celsius
AA	Aminoácido
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNdh	Ácido desoxirribonucleico doble hebra
ADNsh	Ácido desoxirribonucleico simple hebra
ADPGlc	Adenosina difosfo-glucosa
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosina trifosfato
ATP	Adenosina trifosfato
<i>attB/P</i>	Sitio de recombinación específica del bacteriófago HP1
BCIP	5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BE	Enzima ramificante
BSA	Albúmina sérica bovina
Ca <sup>+2</sup>	Catión Calcio
CAZymes	Enzimas activas sobre carbohidratos
CBM	Módulo de unión a carbohidratos
CETAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
Ci	Curio
CMC	Carboximetilcelulosa
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
D1	Dominio SBD1
D123	Dominio SBD123
D2	Dominio SBD2
D23	Dominio SBD23
D3	Dominio SBD3
Da	Dalton
DC	Dominio catalítico
DEPC	Di-etil-pirocarbonato
DIC	Microscopia de contraste por interferencia diferencial
DMD	Digestibilidad de materia seca
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>g</i>	fuerza de gravedad
<i>g</i>	Gramo
GBSS	Almidón sintasa unidas a gránulo
GC/MS	Cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masa
Glc 6P	Glucosa-6-fosfato
Glc1P	Glucosa-1-fosfato
h	Horas
His	Histidina
IEF	Isoelectroenfoque
IPTG	Isopropil b-D-tiogalactopiranósido
Kad	Constante de adsorción
l	Litro
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
M	Molar
MALDI	Desorción/ionización láser asistida por matriz)
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
MMLV	Retrotranscriptasa del Virus de la Leucemia Murina
MS	Murashige and Skoog basal medium with Gamborg's vitamin

NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NBT	Azul de nitrotetrazolio
Ni <sup>+2</sup>	Catión Níquel
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Solución salina tamponada de fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Protein data bank
PEG	Polietilenglicol
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPasa	Fosfoenolpiruvato fosfatasa
PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PFK	Fosfofructoquinasa dependiente de ATP
PFP	Fosfofructoquinasa dependiente de PPi
Pi	Ortofosfato inorgánico
Pir	Piruvato
PKc	Piruvato quinasa citosólica
PKp	Piruvato quinasa plastídica
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro
PPasa	Enzima ADP-glucosa pirofosforilasa
PPi	Pirofosfato inorgánico
PVPP	polivinil poli pirrolidona insoluble
qPCR	PCR cuantitativa
RIA	Residuo insoluble en alcohol
rpm	Revoluciones por minuto
SBD	Dominio de unión a almidón
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SS	Almidón Sintasa
SSI	Almidón sintasa I
SSII	Almidón sintasa II
SSIII	Almidón sintasa III
SSIV	Almidón sintasa IV
T4	Bacteriófago T4
TBE	Tris borato EDTA
TBS	Buffer Tris salino
TEM	Microscopía electrónica de barrido
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
TOF	Tiempo de vuelo
U	Unidades
UA	Unidad de absorbancia
UDP	Uridina difosfato
UDPGlc	Uridina difosfo-glucosa
V/V	Volumen / volumen



# ANGLICISMOS

---

Background	Entorno
Batch retrieval	Consulta en Bloque
Binding	Unión
Box plot	Gráfico de caja y bigotes
Buffer	Solución tampón
Carrier	Gas transportador
Disruptive function	Función disruptiva
Easy-to-hydrolyse	Fácil de hidrolizar
GAP	Brecha
Grid box	Celda malla
Knock-down	Disminución de la expresión génica
Knock-out	Inactivación génica
Loosening effect	Efecto de debilitación
Melting	Fusión
Molecular Docking	Acoplamiento molecular
Protein data bank	Banco de datos de proteínas
Protein threading	Enhebrado proteico
Proximity effect	Efecto de proximidad
Quencher	Extintor
Quenching	Extinción de la fluorescencia
Relative response ratio	Factor de respuesta relativa
Splicing	Empalme
Structure assessment	Evaluación de estructuras
Targeting effect	Efecto de orientación
Twilight zone	Zona crepuscular, incertidumbre



# RESUMEN

---

En la degradación y remodelación de la pared celular intervienen numerosas enzimas y proteínas, y un aspecto común de la estructura de la mayoría de las mismas es su organización modular. Dicha organización incluye típicamente un dominio catalítico característico de cada enzima y uno o más dominios de unión a carbohidratos (CBM). Un CBM es definido como una secuencia contigua de aminoácidos dentro de una enzima activa involucrada en el metabolismo de carbohidratos, que posee la capacidad de unirse a los mismos. Hasta el momento, los CBM más estudiados corresponden a hongos y bacterias y se conoce muy poco de los de enzimas vegetales. Dentro de los CBM se destacan los dominios de unión a almidón (SBD).

Desde abril de 2004 nuestro laboratorio trabaja en la caracterización de la almidón sintasa III (SSIII) de *Arabidopsis thaliana* (AT1G11720). Dicha proteína no había sido clonada ni caracterizada previamente. Los estudios preliminares mostraron que la porción amino terminal es portadora de tres regiones repetitivas con características de dominios SBD, hasta ese momento no descritos en enzimas vinculadas con la síntesis de almidón, pertenecientes a la familia CBM53. Estudiando la capacidad de unión a distintos polisacáridos (almidón, amilosa, amilopectina, celulosa y xilanos) comprobamos que SBD123 tiene la capacidad de unirse a los cinco polisacáridos, dos de ellos componentes de la pared celular vegetal. Esto refleja la promiscuidad de tales dominios, ya que no sólo se unen a sustratos diferentes de su sustrato natural, sino que lo hacen con mayor avidez. Tales experimentos nos permitieron postular el uso de SBD123 como herramienta biotecnológica para modificar la estructura y/o el contenido de pared celular y de almidón de plantas. Para verificar nuestra hipótesis, se construyeron dos líneas de plantas transgénicas que sobreexpresan el extremo N-terminal de SSIII de *A. thaliana* específicamente en pared (E8-SBD123.1 y E8-SBD123.2) y que presentaron características fenotípicas destacables.

Por lo tanto, se propusieron como objeto de estudio los dominios de unión a almidón (“Starch Binding Domains”, SBD, familia CBM53) de la almidón sintasa III de *Arabidopsis thaliana* y los CBM de ATXYN1, una endo-1,4-beta-xilanasa también de *A. thaliana* (familia CBM22). El abordaje fue llevado a cabo, utilizando análisis bioinformáticos, evolutivos e ingeniería de proteínas, así como técnicas moleculares y fisiológicas que nos brindaron información sobre su bioquímica, estructura y función y de su rendimiento o *in vitro* o *in vivo* como herramienta biotecnológica.

En primer lugar, realizamos una caracterización de los parámetros fenotípicos de las plantas E8-SBD123 observando un aumento general en el tamaño y en la biomasa de dichas plantas en comparación con Col-0, además de una modificación en los parámetros de crecimiento

reproductivo (tasa elongación del tallo, proporción de tallo y la longitud del hipocótilo). Estos parámetros se encuentran asociados a la etapa de crecimiento reproductivo, gobernada por la auto-preservación del SAM (meristema apical del tallo) por proliferación celular y la extensión del tallo por expansión celular. Sin embargo, no se observaron diferencias en la longitud del hipocótilo cuando las plántulas fueron sometidas a oscuridad continua.

Adicionalmente se determinó que existe un aumento en la tasa de crecimiento, confirmado por técnicas de microscopía óptica. En el caso de las hojas, observamos que un aumento del 20% en el área foliar en las plantas transgénicas puede ser explicado solamente por un aumento del 20% del área celular promedio, no siendo significativa la contribución del número celular. Adicionalmente, observamos alteraciones en la composición de la pared celular de las plantas transgénicas en distintos órganos. Específicamente observamos aumento en los niveles de hemicelulosas y pectinas, los cuales pueden deberse a una respuesta de la planta para soportar las fuerzas de tensión. Por último, detectamos que estas plantas son capaces de producir mayor cantidad de azúcares fermentables en comparación con Col-0.

Debido a que utilizamos a los SBD de la SSIII para alterar la estructura de la pared celular, y a que los precursores para la síntesis de celulosa y almidón son compartidos, decidimos evaluar los niveles de almidón transitorio y sacarosa, en hojas de las plantas de *A. thaliana* transformadas. Para esto, determinamos el contenido de almidón en función del tiempo, encontrando una disminución significativa a mitad del día en las líneas E8-SDB123.1 y E8-SDB123.2. Además, detectamos una variación en la relación amilosa/amilopectina. Por medio de TEM (microscopía electrónica de transmisión), no pudimos determinar diferencias en el número de gránulos de almidón por cloroplastos, pero si una alteración en la forma y tamaño de los gránulos de almidón.

Adicionalmente, se evidenció una disminución significativa en la actividad almidón sintasa total, y un aumento en la actividad de enzimas como la sacarosa sintasa (SUS) y la invertasa ácida (IA) en ambas líneas transgénicas, en comparación con la línea control. De esta forma, proponemos que el aumento en la actividad IA puede actuar como fuerza motriz de la expansión celular informada en las plantas transgénicas, y que tanto la alteración en la composición de la pared, como el aumento en la biomasa observado en las líneas transgénicas, pueden explicar un aumento en la demanda de azúcares en el apoplasto y, en consecuencia, un aumento en la actividad SUS.

Por otro lado, llevamos a cabo el estudio de los CBM de una xilanasa de *A. thaliana* (AT1G58370) ATXYN1. Esta enzima se expresa predominantemente en los haces vasculares pero no en las células de los vasos. Como muchas de las enzimas de degradación de polisacáridos, ATXYN1 muestra una estructura modular (tres CBM amino terminales en tándem) similar a la de SSIII, pero sus módulos fueron clasificados en la familia CBM22 (previamente familia 4\_9) según su identidad de secuencia.

Así, hemos logrado obtener modelos probables del plegamiento tridimensional que adoptarían los dominios XYL1, XYL2 y XYL3 de ATXYN1, a pesar de compartir solo un 15-17% de identidad con los diversos dominios moldes utilizados. Los tres modelos consistieron en un sándwich  $\beta$  con un surco superficial que constituye el sitio de unión al sustrato, manteniéndose en la posición correcta los residuos putativos involucrados en la unión al sustrato para interactuar con el mismo. Adicionalmente, observamos diferencias en la presencia de los residuos aromáticos críticos, lo que puede justificar posibles roles diferenciales *in vivo* e *in vitro*. Los tres dominios fueron clonados, expresados, y purificados, y se procedió a la evaluación de sus propiedades bioquímicas y espectrofotométricas. Los módulos mostraron diferentes comportamientos en presencia de distintos ligandos, sugiriendo que los mismos están cumpliendo roles no redundantes dentro de la misma proteína.

Por último, hemos ensayado el efecto de estos dominios sobre la actividad enzimática de enzimas comerciales, como la xilanasa de *Thermomyces lanuginosus* (X2753 SIGMA), observando que sólo la presencia de XYL1 es capaz de aumentar la actividad enzimática de esta enzima en aproximadamente un 23%.

# INTRODUCCIÓN

---

Los polímeros son compuestos comunes en la naturaleza. Son macromoléculas constituidas por monómeros unidos mediante enlace covalente, formando cadenas muy largas, las cuales integran distintos materiales, tales como madera, caucho, algodón, cuero, y seda.

Los polisacáridos son polímeros de hidratos de carbono, compuestos de monosacáridos unidos mediante enlaces glucosídicos. Presentan un rango de estructuración muy amplio, abarcando desde polímeros lineales hasta altamente ramificados. Los polisacáridos pueden clasificarse según su función en dos grandes grupos: de almacenamiento, como el almidón y el glucógeno, o estructurales, como la celulosa o la quitina (Wiederschain, 2009).

Reflejando la complejidad de los polímeros naturales, los microorganismos que degradan estas estructuras producen una extensa colección de enzimas, principalmente glucosil hidrolasas, así como también polisacárido liasas, carbohidrato esterasas y polisacárido oxidasas (Gilbert, 2010). Muchas enzimas activas sobre los carbohidratos (“carbohydrate-active enzymes”; CAZymes), son modulares y presentan un dominio catalítico unido a uno o más módulos de reconocimiento de polisacáridos. Este reconocimiento es esencial en varios procesos biológicos, incluyendo interacciones célula-célula, adhesión celular, e interacciones huésped-patógenos (Simpson et al., 2000).

Los módulos no catalíticos de reconocimiento de polisacáridos de las glucosil hidrolasas, originalmente fueron definidos como módulos de unión a celulosa (CBD, por “Cellulose Binding Domain”), debido a la afinidad específica por este polisacárido (Van Tilbeurgh, y col., 1986). Posteriormente, surgió el nombre “módulos de unión a carbohidratos” (“Carbohydrate-Binding Modules”; CBM), con la finalidad de incluir la amplia diversidad de ligandos a la cual pueden adsorberse/adherirse (Boraston, 2004). De esta manera, se define a los CBM como una secuencia contigua de aminoácidos con plegamiento discreto, que posee la capacidad de unirse a carbohidratos (Shoseyov, y col., 2006). Estos dominios se encuentran dentro de una enzima activa involucrada en el metabolismo de carbohidratos. Es este requerimiento lo que clasifica a estas proteínas independientemente de otras no-catalíticas que también participan de la unión a azúcares, como por ejemplo las lectinas y proteínas de transporte. Excepcionalmente, existen CBM que no se encuentran asociados a ningún dominio catalítico, y son denominados *CBM huérfanos* (Henrissat, 1991). Un ejemplo de esto, es la proteína ScaA del celulosoma de *Ruminococcus flavefaciens* (Rincon, y col., 2007).

## Clasificación de los CBM

Una gran variedad de CBM, ya sea caracterizados o putativos, fueron clasificados en familias en base a su identidad de secuencia de aminoácidos (Cantarel, y col., 2009b). A la fecha, se han identificado 76.110 secuencias, de las cuales 75.715 fueron clasificadas en 81 familias, basados en su secuencia aminoacídica, su especificidad de unión a sustrato y su estructura (Cantarel, y col., 2009b) (a Julio 2016). Esta base de datos se denomina CAZy (“Carbohydrate Active enZyme, <http://www.cazy.org/CAZy>”), y clasifica las proteínas a partir del tipo de actividad enzimática asociada (glucosil hidrolasa; glucosiltransferasa, polisacárido liasa, carbohidrato esterasa) o según los módulos asociados (CBM) (Hashimoto, 2006).

Los módulos de unión a carbohidratos presentan una longitud variable, desde 30 a 200 aminoácidos, y han sido encontrados tanto en proteínas hidrolíticas, como no hidrolíticas. Algunas proteínas con actividad hidrolítica, como por ejemplo celulasas y xilanasas, poseen una compleja estructura molecular comprendiendo uno o varios módulos discretos, unidos por secuencias poco estructuradas. Su ubicación puede ser tanto N- como C-terminal y ocasionalmente pueden encontrarse posicionados centralmente en la cadena polipeptídica (Shoseyov, y col., 2006).

## Nomenclatura de los CBM

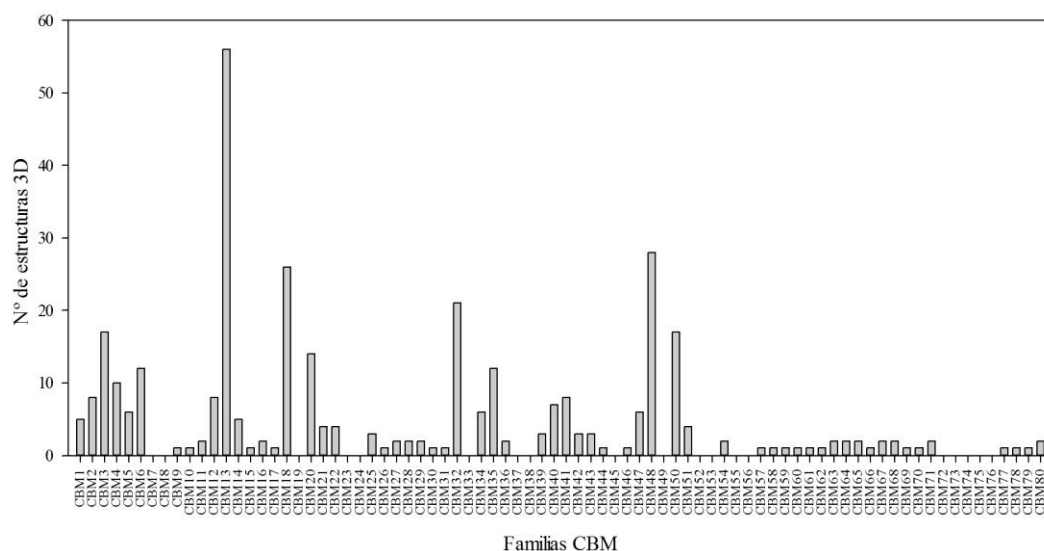
La forma más clara de nombrar a los CBM implica la utilización de la familia, el organismo e incluso el nombre de la enzima. Por ejemplo, el CBM de la celulasa Cel5A de *Clostridium cellulovorans* de la familia 17, puede ser definido como CcCel5ACBM17. Adicionalmente, si la enzima contiene CBM en tándem de la misma familia, los mismos pueden numerarse respecto a la posición del módulo respecto al extremo N-terminal de la proteína (Boraston, 2004). Esta nomenclatura, permitió la determinación una gran cantidad de secuencias de manera inequívoca, unificando los criterios de clasificación.

Con la rápida expansión de técnicas de secuenciación de nueva generación (“next generation sequencing”; NGS), como por ejemplo la “secuenciación tipo escopeta de ADN metagenómico” (“Whole genome shotgun sequencing”), se ha generado la oportunidad de descubrir una gran cantidad de CBM potenciales. De esta manera, múltiples familias fueron identificadas y adicionadas a la base de datos CAZy recientemente (Abbott, y col., 2008; Cantarel, y col., 2009b).

La base de datos CAZy, estructura la información mediante el uso de los siguientes campos: (i) anotación de secuencias de base de datos públicas (NCBI), incluyendo información taxonómica, de secuencia y de referencia; (ii) clasificación en familias; y (iii) información funcional conocida (Cantarel, y col., 2009b). Cada familia depende de la definición de los límites de cada dominio, dentro de la secuencia completa de cada proteína. Estos límites se derivan de la información obtenida durante la caracterización bioquímica y/o estructural de miembros pioneros de cada familia. Finalmente, el uso de herramientas de comparación de secuencias como DELTA-BLAST (Boratyn, y col., 2012) y HMMER (Eddy, 1995) permite la asignación de secuencias putativas (Cantarel, y col., 2009b).

### Familias de plegamientos

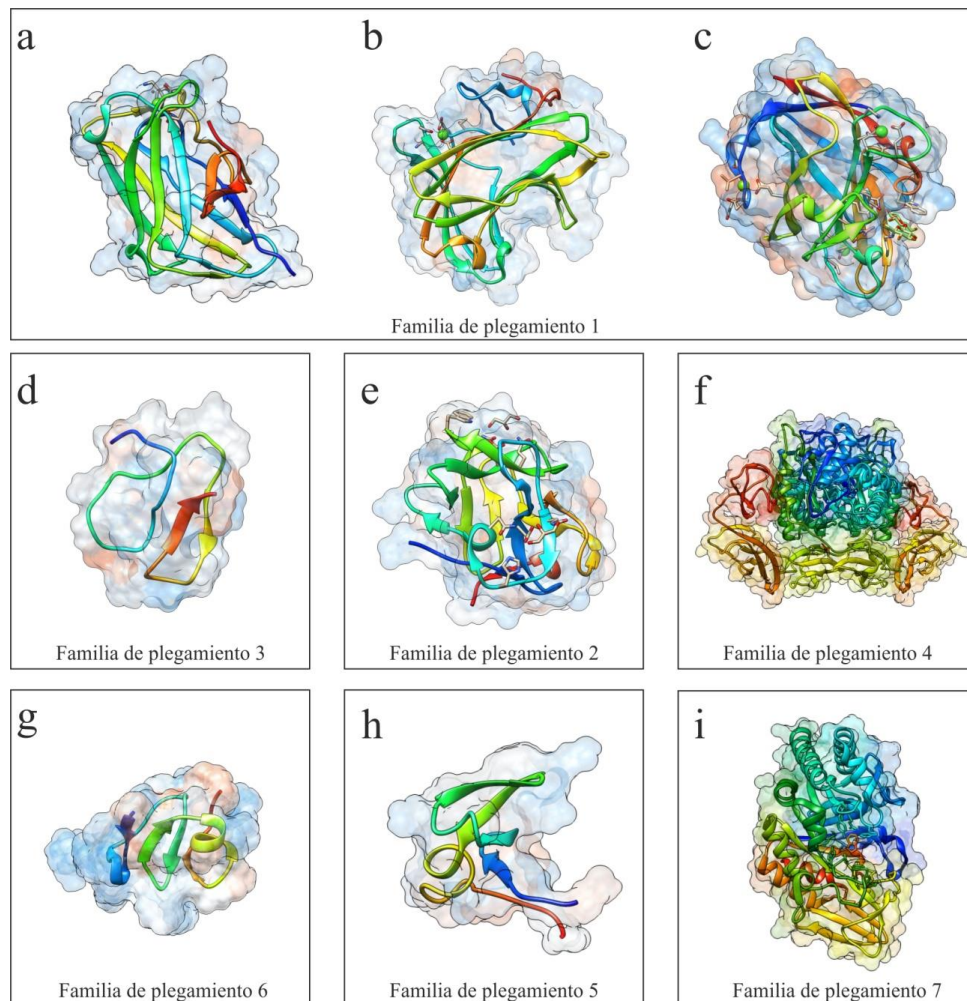
Hasta la fecha, las estructuras tridimensionales de 345 módulos fueron determinadas mediante cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear (RMN). Estas estructuras, se encuentran distribuidas heterogéneamente a lo largo de todas las familias (Figura A-1). Además de la clasificación por similitud de secuencia, los CBM pueden dividirse en familias de acuerdo a su plegamiento proteico y estructura tridimensional. En 2004, Boraston y colaboradores clasificaron las estructuras de los CBM en 7 familias de plegamientos: sándwich  $\beta$ ; trébol  $\beta$ ; nudo de cisteína; único; plegamiento OB; plegamiento “heveína”; y único con plegamiento tipo



**Figura A-1: Histograma de frecuencias de las estructuras tridimensionales de módulos de unión a carbohidratos discriminado por familia.**

Los números de estructuras tridimensionales corresponden a Julio de 2016.





**Figura A-2 Familias de plegamiento de los CBM (representados como cintas).**

Los CBM que se muestran son los siguientes: a) CBM de *Clostridium thermocellum* (CtCBM3), PDB ID 4B9C (Yaniv, 2014); b) CBM de *C. thermocellum* (CtCBM4), PDB ID 3P6B (Alahuhta, y col., 2011); c) CBM de *Thermotoga maritima* (TmCBM9), PDB ID 1I82 (Notenboom, y col., 2001); d) CBM de *Trichoderma reesei* (TrCBM1), PDB ID 4BMF (Mattinen, y col., 1998); e) CBM de *Clostridium botulinum* (CbCBM13), PDB ID 3WIN (Amatsu, y col., 2013); f) CBM de *Moritella marina* (MmCBM5), PDB ID 4HMC (Malecki, y col., 2013); g) CBM de *Triticum kiharae* (TkCBM18) PDB ID 2LB7 (Dubovskii, y col., 2011); h) CBM de *Cellvibrio japonicas* Ueda107 (CjCBM10), PDB ID 1E8R (Raghothama, y col., 2000); i) CBM de *Homo sapiens* (HsCBM14) PDB ID 1WAW (Rao, y col., 2005). Las imágenes fueron generadas utilizando el software Chimera (Pettersen, y col., 2004). Tomado y modificado de (Oliveira, y col., 2015).

“heveína” (Boraston, 2004) (Figura A-2).

### Familia de plegamiento 1: Sándwich $\beta$

El plegamiento sándwich  $\beta$  es el mayoritario dentro de los CBM. En muchos casos, se encuentran unidos a iones metálicos, los cuales contribuyen principalmente a la estabilidad de la

estructura, aunque en algunos casos están involucrados a la unión del sustrato (Jamal, y col., 2004). Este plegamiento comprende 2 láminas  $\beta$ , cada una de las cuales consta de 3 a 6 cadenas antiparalelas (Figura A-2a-b-c). Este plegamiento es similar al de las lectinas, galectinas, pentraxinas, espermadhesinas y calnexinas, aunque no comparten similitud de secuencia con estas proteínas (Boraston, 2004). En la mayoría de los CBM con este plegamiento, el sitio de reconocimiento del ligando en estas proteínas se encuentra en la misma cara que el sándwich  $\beta$ , aunque en algunos casos se encuentra en el extremo del mismo.

### Familia de plegamiento 2: Trébol $\beta$

El plegamiento trébol  $\beta$  es el segundo más frecuente. Este plegamiento está compuesto por unidades bien definidas. Estas constan de una secuencia contigua de aminoácidos que forman cuatro cadenas  $\beta$ , dispuestas en una estructura de doble horquilla (Boraston, 2004; Oliveira, y col., 2015). En un nivel de estructuración mayor, tres unidades interaccionan de la siguiente manera: en la parte superior, cada unidad contribuye con una horquilla (dos cadenas  $\beta$ ), formando una estructura de barril  $\beta$ ; en la parte inferior, cada unidad contribuye con la horquilla restante, para formar un triplete de horquilla. Este triplete actúa como capuchón en un extremo del barril (Murzin, y col., 1992). El plegamiento resultante, puede observarse en la Figura A-2e, en donde se representa el CBM13 de la xilanasa XYN10A de *Streptomyces lividans* (PDB ID: 1KNL). Miembros de la familia CBM13 y 45 presentan mayoritariamente este tipo de plegamiento (Hashimoto, 2006).

Los plegamientos sándwich  $\beta$  y trébol  $\beta$  son relativamente simples. Sin embargo, son estructuras en las que se pueden acomodar una gran diversidad de polisacáridos ramificados (Boraston, 2004). En contraste, las familias de plegamiento 3, 4 y 5, constan de pequeños polipéptidos de 30 a 60 aminoácidos formando estructuras terciarias a partir de sólo algunas cadenas  $\beta$  y bucles desestructurados (Boraston, 2004; Oliveira, y col., 2015). De esta manera, estas familias solo presentan afinidades específicas (a celulosa o quitina), a partir de sitios de unión a carbohidratos planares (Malecki, y col., 2013).

### Familia de plegamiento 3: Nudo de cisteína

Este plegamiento es uno de los menos frecuentes en todas las familias CBM. De hecho, sólo se encuentra en algunos miembros de la familia CBM1 (Oliveira, y col., 2015). En la Figura A-2d, se puede observar la estructura del CBM1 de una endo- $\beta$ -1,4-glucanasa I de *Trichoderma reesei* (Uniprot ID: P07981). Este arreglo consiste en tres cadenas  $\beta$ , las cuales forman una estructura

con forma de cuña. Esta disposición se encuentra estabilizada por dos puentes disulfuros formados por cuatro cisteínas altamente conservadas (Mattinen, y col., 1998).

#### **Familia de plegamiento 4: Único**

Este tipo de plegamiento se encuentra formado por un número variable de cadenas  $\beta$  antiparalelas, conectadas por bucles largos. Las familias CBM 5 y 12 presentan dominios con esta estructura tridimensional. Por ejemplo, la quitinasa 60 de *Moritella marina* (Uniprot ID: B1VBB0) presenta un CBM de la familia 5 en su extremo N-terminal, con afinidad por quitina (Figura A-2f) (Malecki, y col., 2013). Este dominio presenta 4 cadenas  $\beta$  antiparalelas, conectadas por bucles. Por otro lado, la estructura de la quitinasa ChiB de *Serratia marcescens* (Uniprot ID: Q54276), también presenta un dominio CBM 5 con el mismo plegamiento, aunque en este caso formado por tres cadenas  $\beta$  antiparalelas. En ambos ejemplos, se exponen residuos aromáticos que presentan una disposición coplanar, muy importante para la unión a quitina (van Aalten, y col., 2000).

#### ***Familia de plegamiento 5: Plegamiento OB.***

Esta familia de plegamiento se denomina OB porque presenta la capacidad de unirse a oligonucleótidos y/u oligosacáridos ("oligonucleotide/oligosaccharide-binding") (Oliveira, y col., 2015). Estos plegamientos constan de barriles  $\beta$  cerrados, cada uno formado por 5 cadenas  $\beta$  antiparalelas y una  $\alpha$ -hélice, entre la tercera y cuarta cadena, actuando como capuchón (Raghothama, y col., 2000) (Figura A-2h). Los bucles que conectan las cadenas  $\beta$ , presentan una gran variabilidad de secuencia, longitud y conformación, contribuyendo de esta forma a la especificidad de sustrato. Todas las proteínas con este plegamiento, presentan el sitio de unión en el extremo opuesto de la  $\alpha$ -hélice. Estos dominios también se encuentran en proteínas con capacidad de unión a ADN simple hebra (ADNsh) (Flynn y Zou, 2010).

#### ***Familia de plegamiento 6: Plegamiento "heveína"***

Los dominios del tipo "Heveína" son pequeños (aprox. 40 residuos aminoácidos) y originalmente fueron identificados como dominios de unión a quitina. En estos dominios predomina la ausencia de plegamiento definido (ovillo estadístico). Sin embargo, presentan dos pequeñas cadenas  $\beta$  y una pequeña región con estructura  $\alpha$ -hélice (Figura A-2g). A pesar de su reducido tamaño, puede acomodar un sitio de unión a polisacárido extenso (Boraston, 2004; Oliveira, y col., 2015).

#### ***Familia de plegamiento 7: Único con plegamiento tipo "heveína"***

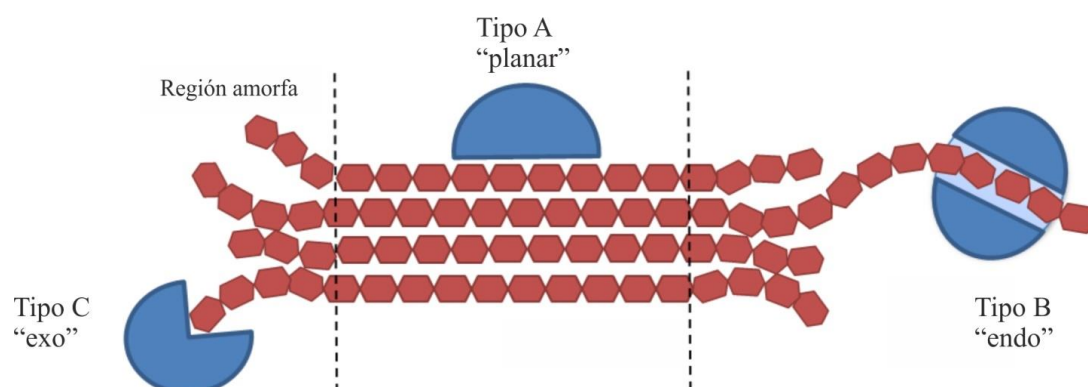
En esta familia, se ubican las proteínas que presentan un plegamiento del tipo heveína, fusionado a estructuras más grandes, formadas por láminas  $\beta$  o  $\alpha$ -hélices. En esta familia, se encuentran miembros de la familia CBM14, como por ejemplo la quitinasa Chit1 (UniprotID : Q13231) de *Homo sapiens* (Figura A-2i) (Rao, y col., 2005).

### Relación entre estructura y función: Tipos de CBM

A pesar que las familias de CBM pueden agruparse por el tipo de plegamiento, esta clasificación no es capaz de predecir adecuadamente la función de los mismos. Esto se debe a que existe una gran diversidad de elementos funcionales, como residuos aminoacídicos específicos o la topología del sitio de unión (Legrand, y col., 2016) que pueden afectar directamente la función de cada dominio. Sin embargo, los CBM también pueden clasificarse según la región del sustrato a la cual se unen (Figura A-3), permitiendo dar una visión más clara de la relación estructura-función (Gilbert, y col., 2013; Walker, y col., 2015).

Los CBM **Tipo A**, se unen a la superficie de las regiones estructuradas de sustratos altamente organizados, tales como la celulosa y quitina (Venditto, y col., 2015), y muy poca afinidad por carbohidratos solubles (Boraston, 2004). Dentro de esta clasificación, se encuentran dominios de las familias CBM1, CBM2, CBM3, CBM5 y CBM10. Los sitios de unión de estos dominios constan de residuos aromáticos arreglados en una disposición plana (Gilbert, y col., 2013), complementaria a la superficie formada por los cristales de celulosa (Tormo, y col., 1996), lo cual fue probado por microscopía de transmisión electrónica (MTE) (Lehtio, y col., 2003).

Los CBM **Tipo B** se unen a las regiones internas de las cadenas de polisacáridos (tipo “endo”),



**Figura A-3 Clasificación de los CBM según la región de unión al sustrato.**

Tomado y modificado de ([https://www.cazypedia.org/index.php/Carbohydrate-binding\\_modules](https://www.cazypedia.org/index.php/Carbohydrate-binding_modules))

siendo el grupo más numeroso. El sitio de unión típico de este grupo comprende surcos extensos en los cuales se acomodan las cadenas de polisacáridos más extensas, incluso con ramificaciones voluminosas como las presentes en los xiloglucanos (Walker, y col., 2015) y presenta una topología adaptada para interaccionar con glucanos individuales en lugar de superficies cristalinas. Normalmente estos dominios no presentan especificidad por las cadenas laterales de sus sustratos (Gilbert, y col., 2013).y están incluidos en las familias 2b, 4, 6, 15, 17, 20, 22, 27, 28, 29, 34 y 36.

Los CBM **Tipo C**, se unen a los extremos de los glucanos (reductor o no reductor), por lo cual también se denominan del tipo “exo”. Los sitios de unión de este grupo, se encuentran dentro de bolsillos capaces de reconocer ligandos cortos, conteniendo de uno a tres unidades de monosacáridos (similar a las lectinas) (Walker, y col., 2015). Las familias CBM9, CBM13, CBM 14, CBM 18, CBM32, CBM47, CBM66 y CBM67, presentan este tipo de CBM (Boraston, 2004; Gilbert, y col., 2013).

La diferencias entre los CBM tipo B y C es muy sutil. Por ejemplo, el CBM6 tipo B de la xilanasas XynA de *Clostridium stercorarium* (Uniprot ID Q8GJ44) presenta un plegamiento similar al CBM32 tipo C de *Micromonospora viridifaciens* (Uniprot ID : Q02834), aunque une polisacáridos más largos (Gaskell, y col., 1995). El reducido número de CBM del tipo C, en comparación con los del tipo A y B, se debe a la presencia limitada de los mismos en Glucosil hidrolasas asociadas a la pared celular de plantas. De hecho, este tipo de CBM se encuentran asociados a enzimas o toxinas dirigidas a células eucariotas (Boraston, 2004).

### ***Función de los CBM***

Los CBM tienen cuatro roles principales de acuerdo con la función del dominio catalítico asociado: efecto de orientación (“targeting effect”), efecto de proximidad (“proximity effect”) (Oliveira, y col., 2015), función disruptiva (“disruptive function”) y adhesión (Montanier, y col., 2009).

El efecto de orientación permite elegir como blanco distintas regiones dentro de un sustrato polisacárido macromolecular. Por ejemplo, la arquitectura del sitio de unión puede dirigir a las enzimas a los extremos reductores, no reductores, o cadenas de polisacáridos internas. De esta manera, se han utilizado CBM de distintas familias para dirigir módulos catalíticos a diversas regiones de un polisacárido químicamente homogéneo (Carrard, y col., 2000).

El efecto de proximidad aumenta la concentración enzimática cerca del sustrato, permitiendo una catálisis más rápida y eficiente del mismo (Bolam, y col., 1998). Un ejemplo de esto, es la disminución de actividad de dominios catalíticos, en ausencia de sus CBM, frente a sustratos insolubles pero no solubles (Gilbert, y col., 2013). Los CBM tipo B, normalmente presentan este efecto cuando se encuentran asociados a enzimas como celulasas, xilanasas y mananasas. Así, mantienen la proximidad al sustrato diana dentro de estructuras macromoleculares, como la pared celular vegetal (Hervé, y col., 2010).

El efecto disruptivo permite desestructurar los polisacáridos ceñidos dentro de estructuras ordenadas, tales como las fibras de celulosa y gránulos de almidón. Esto causa que el sustrato se relaje y se exponga a la acción catalítica. Este efecto ha sido descrito en módulos de la familia CBM2 (e.g. Cel6A de *Cellulomonas fimi*) (Gilkes, y col., 1988), y CBM20 (glucoamilasa de *Aspergillus niger*) (Hall, 1995), entre otros.

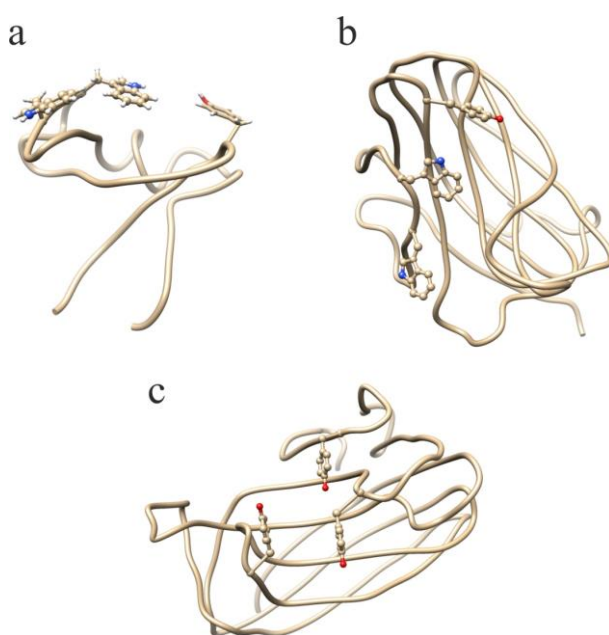
Se ha demostrado que algunos CBM son capaces de adherirse a superficies específicas, permitiendo que los dominios catalíticos actúen sobre carbohidratos cercanos. Algunos miembros de la familia CBM35, como el de la exo- $\beta$ -D-glucosaminidasa (CsxA) de la bacteria *Amycolatopsis orientalis*, es capaz de adherirse a la pared celular bacteriana rica en ácido glucurónico, mientras que el módulo catalítico es capaz de depolimerizar el chitosán proveniente de la pared celular de especies fúngicas que compiten en el mismo nicho biológico (Montanier, 2009; Venditto, y col., 2015).

### **Fuerza motriz en la interacción CBM-carbohidrato.**

La interacción de residuos de aminoácidos aromáticos con los carbohidratos, es crítica en el reconocimiento de los mismos. Estos residuos son: triptófano, tirosina, y, en menor medida, fenilalanina, y pueden disponerse de manera planar, retorcida o en sándwich. Estos residuos forman interacciones de apilamiento hidrofóbico con la cara plana de los anillos de azúcar. De esta manera, ocurren interacciones electrostáticas débiles entre los electrones  $\pi$  del sistema de anillos (*apilamiento  $\pi$ - $\pi$* ) (Sinnokrot, y col., 2002), contribuyendo con un cambio de entalpía ( $\Delta H$ ) de 1.5 a 2.5 kcal/mol (Meyer, y col., 2003). Por ello, la topología del sitio de unión de los distintos tipos de CBM (A, B o C), es esencial para determinar la especificidad de sustrato. La relación entre la afinidad y la función de los CBM frente a los diversos sustratos, demostraron que en ciertos casos, algunos CBM interaccionan de manera dinámica. Por ejemplo, Jervis y colaboradores (Jervis, y col., 1997) determinaron, mediante técnicas de fluorescencia, que el dominio CBMC<sub>ex</sub> presenta una movilidad funcional sobre la superficie de la celulosa cristalina.

Por otro lado, los hidratos de carbono presentan una capacidad considerable para la formación de puente de hidrógeno. Éstos se forman entre los grupos hidroxilos de los ligandos, moléculas de agua, y los residuos de los aminoácidos polares que se localizan dentro del sitio de unión. La importancia relativa de la formación de puentes de hidrógeno depende del tipo de CBM.

En el caso de los CBM tipo A, los residuos se disponen de manera planar (Figura A-4a) en concordancia con su afinidad por la superficie de sustratos cristalinos. En estos CBM, los puentes de hidrógeno entre residuos polares y los sustratos, parecen cumplir un rol menor en el reconocimiento del ligando, ya que la mutación de éstos a Ala tiene muy poco efecto en su afinidad (McLean, y col., 2000). De esta manera, se sugiere que la asociación con los sustratos se favorece por un aumento en la entropía del sistema mediada por la liberación de moléculas de agua de la proteína y el ligando (Creagh, y col., 1996). Sin embargo, esto es controvertido debido a la gran desestructuración en regiones particulares de los sustratos (Boraston, 2004).



**Figura A-4 Plataformas de unión formada por los residuos aromáticos.**

a) Conformación planar del CBM tipo A CjCBM10. b) Conformación retorcida de la plataforma del CBM tipo B, PeCBM29-2. c) Conformación sándwich del CBM tipo B CfCBM4-2. El esqueleto de C- $\alpha$  de muestra como un cilindro dorado, mientras que los residuos aromáticos se muestran como “bolas y varas”. Los átomos de las cadenas laterales de los residuos aromáticos, resaltados en rojo representan el oxígeno, mientras que los resaltados en azul representan el nitrógeno. Tomado y modificado de (Boraston, 2004). Las imágenes fueron generadas utilizando el software Chimera (Pettersen, y col., 2004).

En contraste con los CBM tipo A, la localización de las cadenas laterales de ciertos aminoácidos en los CBM tipo B junto con las estructuras formadas por los bucles, permiten formar los surcos en donde se selecciona el tipo de ligando. Además, la presencia de puentes de hidrógeno juega un rol fundamental en la determinación de la afinidad en este tipo de CBM (Boraston, 2004). Adicionalmente, los tres residuos de aminoácidos esenciales pueden flanquear ambas caras de los anillos de piranosa en una estructura de sándwich (Figura A-4c). Alternativamente, la plataforma apolar puede torcerse debido a la rotación de dos de los tres residuos generando una conformación torcida (“twisted”) (Figura A-4b) y ambas estructuras podrían acomodar las conformaciones adoptadas por los oligosacáridos solubles. Por ejemplo, estudios de difracción de rayos X determinaron que el xilano puede adoptar una conformación de triple hélice en solución (Boraston, 2004), la cual es compatible con la distribución del sitio de unión de CBM miembros de la familia 6 (Boraston, y col., 2003).

### **Promiscuidad y multivalencia de los CBM.**

Debido a la gran diversidad en la estructura y en los motivos de los carbohidratos presentes en la naturaleza, algunos CBM se adaptaron para reconocer a más de un tipo de sustrato. Este fenómeno se denomina “*promiscuidad*”. Por ejemplo, un CBM32 de *Clostridium perfringens* acomoda N-acetil-glucosamina en un subsitio primario y N-acetil-glucosamina o manosa en un subsitio secundario (Ficko-Blean y Boraston, 2009). Esto contribuye con la eficiencia en la orientación de la enzima dentro de un ambiente complejo (*e.g.* pared celular).

La interacción CBM-Carbohidrato es relativamente débil. Las constantes de afinidad ( $K_a$ ) se encuentran en el rango de  $\text{mM}^{-1}$  a  $\mu\text{M}^{-1}$ , permitiendo que la interacción sea reversible. Esto permite que el dominio catalítico pueda unirse a regiones nuevas del sustrato una vez que la catálisis se haya completado.

Debido a esto, la multivalencia (interacción colectiva con un ligando) ha permitido aumentar la afinidad global de algunas enzimas por su sustrato (Wayllace, y col., 2010). La forma más común de multivalencia implica una arquitectura modular en donde los CBM se encuentran arreglados en tándem, o en extremos opuestos de la misma proteína (Palopoli, y col., 2006). Estos CBM normalmente son afines a la misma región del sustrato, aunque pueden unirse a distintas regiones del mismo o incluso, a distintos ligandos. Una forma menos frecuente de multivalencia implica la presencia de múltiples sitios de unión dentro de un mismo CBM (CBM6, CBM13, y CBM20) (Southall, y col., 1999).

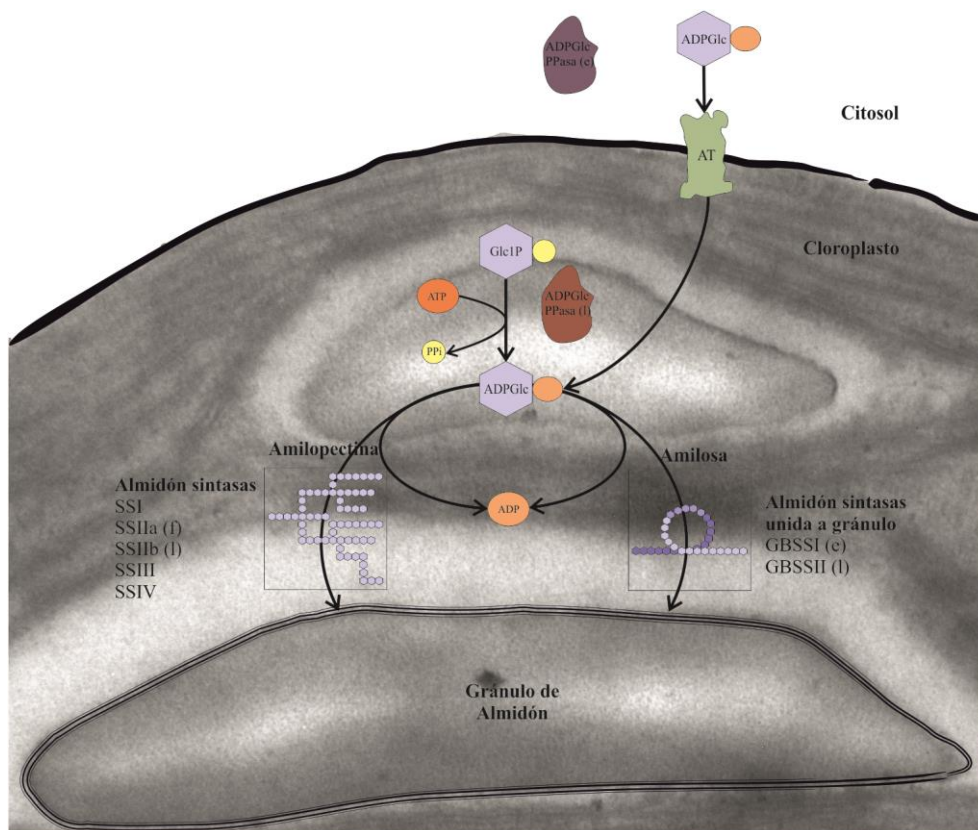


## Dominios de unión a almidón (SBD)

Hasta el momento, los CBM más estudiados corresponden a hongos y bacterias y se conoce muy poco de los de enzimas vegetales. Dentro de los CBM se destacan los dominios de unión a almidón (“starch binding domains”; SBD). Los SBD son módulos estructurales discretos con capacidad de unión a almidón. Estos dominios se consideran como una ventaja evolutiva dado que rompen los sustratos estructurados (como el gránulo de almidón) más eficientemente debido a la presencia de dos sitios de unión a polisacáridos (Tormo, y col., 1996; Southall, y col., 1999). Los SBD fueron clasificados en nueve familias: CBM20, 21, 25, 26, 34, 41, 45, 48 y 53

## El almidón y su biosíntesis

El almidón se compone de dos tipos de homopolímeros de glucanos, amilosa y amilopectina



**Figura A-5 Reacciones de síntesis del almidón en plantas.**

Se indican las diferentes isoenzimas, según se encuentren predominantemente en hoja (I) o endoesperma (e). AT, transportador de adenilato (“adenylate transporter”). Tomado y modificado de (Busi, y col., 2014).

(Buleon, y col., 1998), y es producido mediante la acción coordinada de dos grupos de enzimas (Figura A-5), incluyendo la ADP-glucosa- pirofosforilasa (ADPGlc PPasa), almidón sintasa (SS), y enzimas ramificantes (SBE) y desramificantes (DBE) del almidón (Ball y Morell, 2003; James, y col., 2003; Tetlow, y col., 2004; Zhang, y col., 2008; Busi, y col., 2014). Cada SS tiene una función específica, la cual se lleva a cabo en lugares específicos, y por lo tanto, son enzimas no redundantes: la almidón sintasa unida a gránulo (GBSS) se encuentra casi exclusivamente unida al gránulo, mientras que las otras cuatro clases de enzimas se distribuyen entre el estroma y el gránulo (SSI, SSII), o se encuentran meramente en el estroma (SSIII, SSIV) (Denyer, y col., 1993; Zhang, y col., 2008; Busi, y col., 2014). De hecho, se ha descrito que cada isoforma soluble juega un rol diferente en la biosíntesis de amilopectina (Wayllace, y col., 2010): mientras que la SSII y SSIII poseen un papel mayoritario en la síntesis de amilopectina, la SSI se encuentra principalmente involucrada en la síntesis de las cadenas pequeñas de esta fracción (Delvalle, y col., 2005). Actualmente se sugiere que la SSIV se encuentra involucrada en el control del número de gránulos, y en la iniciación de los mismos (Szydlowski, y col., 2009).

### **La almidón sintasa III de *Arabidopsis thaliana*.**

Dentro de las isoformas solubles de la SS, se encuentra la SSIII (Uniprot ID: F4IAG2). En un principio se ha postulado que esta enzima juega un rol regulatorio dentro de la biosíntesis del almidón, debido a que dos mutantes insercionales en el locus AtSS3 (AT1G11720) presentan un fenotipo de exceso de almidón y un incremento en la actividad total SS (Zhang, y col., 2005). Adicionalmente, se ha descrito que el extremo N-terminal de la SSIII puede interactuar con la SSI de *Zea mays* (Hennen-Bierwagen, y col., 2008).

La almidón sintasa III (SSIII) de *Arabidopsis thaliana* contiene una estructura modular típica, la cual comprende de un péptido tránsito N-terminal para la localización en cloroplasto, seguido de tres secuencias SBD repetidas y denominadas D1, D2 y D3 (residuos 22–591), y un dominio catalítico C-terminal (residuos 592–1025) siendo este último dominio estructuralmente similar a la de la glucógeno sintasa bacteriana (Palopoli, y col., 2006; Busi, y col., 2008; Valdez, y col., 2008; Gomez-Casati, y col., 2013). Estudios de isoformas truncadas de la SSIII determinaron que la región D23 presentan un rol regulatorio de la actividad almidón sintasa, además de presentar capacidad de unión a almidón (Valdez, y col., 2008). Adicionalmente, se determinaron los residuos responsables de la regulación en SSIII. De esta manera, la región D(316–344) dentro del dominio D2, y la región D(495–535) dentro de D3, son capaces de incrementar la actividad catalítica de la enzima, mediante la interacción con el dominio catalítico (Wayllace, y col., 2010).

Estudios de unión a almidón y sus componentes individuales, amilosa y amilopectina, demuestran que D1 es esencial en la afinidad de esta enzima por la fracción amilosa (Valdez, y col., 2011). Esta preferencia del SBD123 por la fracción lineal del almidón (Valdez, y col., 2011), además de la promiscuidad en la unión de los SBD, y la presencia de dos sitios de unión a polisacáridos, los cuales han sido predichos *in silico* y experimentalmente, junto con la habilidad de los SBD para actuar *in trans* con el dominio catalítico de AtSSIII (Wayllace, y col., 2010), nos ha llevado a postular que estos dominios pueden unirse a otros polisacáridos diferentes a sus sustratos naturales, tales como polisacáridos de pared celular.

### ***Aplicaciones biotecnológicas de los CBM***

Según lo expuesto hasta aquí, los CBM se han convertido en excelentes sistemas modelos para el estudio del reconocimiento proteína-carbohidrato. Adicionalmente, la diversidad en la especificidad de ligando consolida el uso de estos módulos en numerosas aplicaciones biotecnológicas (Tomme, y col., 1998). De esta manera, distintos CBM fueron utilizados para las siguientes aplicaciones: como etiqueta de afinidad para purificación de proteínas (CBM9) (Kavoosi, y col., 2004); como sondas para identificar motivos de carbohidratos en tejidos de plantas (Hervé, y col., 2010) y mamíferos (van Bueren, y col., 2007); modificación de fibras en procesos de generación de pulpa de celulosa; entrecruzamiento de fibras de polisacáridos para biomateriales (Shoseyov, y col., 2006); modificación de fibras de algodón (Zhang, y col., 2011); inmovilización de células en superficie de carbohidratos (Simsek, y col., 2013); incremento en la eficiencia de enzimas de uso industrial mediante la construcción de quimeras (Gourlay, y col., 2012; Han, y col., 2013).

# MATERIALES Y MÉTODOS

---

## **Material Biológico:**

### **Cultivares de *A. thaliana***

Se utilizaron plantas de *A. thaliana* variedad Columbia (*Col-0*) de tipo salvaje y plantas de *A. thaliana* transgénicas (EXP8At-SBD123). Las semillas se plantaron en macetas conteniendo tierra, perlita y vermiculita (3:1:1 v/v), y fueron regadas con agua y solución Hoagland al 50%. El régimen lumínico fue de día largo (16 h luz, 8 h oscuridad) a una intensidad de 4500–6000 lux. La temperatura promedio del cuarto de crecimiento de plantas fue de 25°C.

### **Cepas de células utilizadas**

***E. coli* XL1-Blue:** recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIZ M15 Tn10 (TetR)].

***E. coli* BL21 (DE3):** F', ompT, hsdSB (rB<sup>-</sup>, m B<sup>-</sup>), dmc, gal, (DE3).

***E. coli* DB3.1:** F-gyrA462endA1 gln V44 (sr1-reA) mcrB mrr hsdS20 (rB<sup>-</sup>, mB<sup>-</sup>) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 (smr) xyl5 leu mtl1.

***A. tumefaciens*:** cepa GV3101, plásmido Ti: pTiC58, chromo C58, kanR, opinas: Nopalina (Holters et al., 1980).

### **Medios de cultivo:**

**Medio LB (Luria Bertani):** Tripteína 10 g; Extracto de levadura 5 g; NaCl 10 g; Agua c.s.p. 1 litro. pH 7.0.

**Medio LB agar:** medio LB con el agregado de 15 g/l de agar.

**Medio MS** (“Murashige and Skoog basal medium with Gamborg’s vitamin”): MS, Sigma M 0404

**Medio de selección para semillas de *Arabidopsis* transformadas:** Se prepararon cajas de Petri de forma estéril con medio MS, 0.8% P/V de agar, 1% de sacarosa y el antibiótico Kanamicina a una concentración de 50 µg/ml

**Soluciones Buffer:**

**10 X TBE Buffer:** Tris-base 108 g; ácido bórico 55 g; 0.5 M EDTA; agua c.s.p. 1 litro. pH 8.0.

**TE Buffer:** Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; agua c.s.p. 800 ml; ajustar pH 8 con HCl; Agua c.s.p. 1 litro.

**10 X PBS:** NaCl 80 g; KCl 2 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 26.8 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.4 g; agua c.s.p. 800 ml; HCl hasta pH 7.4; agua c.s.p. 1 litro.

**10X Citrato-fosfato Buffer pH5:** Ácido cítrico 48,5 ml 0,1 M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 51,50 ml 0,2M.

**Buffer de Infiltración (extracción de apoplasto):** Tris-HCl 0,1 M; NaCl 0,2 M pH=8.

**Buffer de Infiltración (transformación de *A. thaliana*):** Sacarosa 5%, detergente Silwet L-77R (HELENA CHEMICAL COMPANY) 0,03%.

**Antibióticos y otros compuestos relacionados:**

Compuesto	Concentración en cultivo
Ampicilina	50 µg / ml
Cloranfenicol	50 µg / ml
Kanamicina	25 µg / ml
Gentamicina	25 µg / ml
Rifampicina	100 µg / ml
Spectinomycin	100 µg / ml
Isopropil β-D-tiogalactopiranosido (IPTG )	0.6 mM
5-bromo-4-cloro-3-indoil-β-D-galactopiranosido (XGal)	

**Tabla B-1 Antibióticos y otros compuestos utilizados**

**Oligonucleótidos utilizados:**

Nombre	Secuencia	nt
XYL UP	AAATCAAGGAGCTCCATGGAGGTTTCAAGA	30
XYL 2 UP	GAAGAGAGCTCTATTGTAGTGAACCCAAAC	30
XYL 3 UP	CCTGCGAGCTCAGTAAACATACTCACAAAT	30
XYL DC UP	AGAGTGAGCTCGATAAGAAATAGCTTCCCG	30
XYL DOWN	CAAGCGGGTACCTCACAAACCTTGAAGATC	30
XYL 2 DOWN	AATTTTGGTACCTCATTTTACAGTTAAGCTA	31
XYL 3 DOWN	CGCGGTACCTCAGACGGGAAAAATCTGCAA	30
XYL1 Fw	GAGCTCCAATGTAATTGTGAATCA	24
XYL1 Rv	GGTACCTTCGCGGTGGATG	19
InsTGAXYL1Fw	GTTACCATCCACCGCAATGAGGTACCATGGAATTC	36
InsTGAXYL1Rv	CAATGGTAGGTGGCGCTTACTCCATGGTACCTTAAG	36

XYL2Rv PCT	AATTTTCTCGGCGTGTTTTACAGTTAAGCTA	31
XYL2Fw PCT	TGAAGATGAGACTATTGTAGTGAACCCAAAC	31
XYL3Fw PCT	TCCTGCATTTGGAGTAAACATACTACAAAT	31
XYL3Rv PCT	TCGCGAGTCGATCGACGGGAAAAATCTGCAA	31
XYL1 W89A Fw	AGTTGTCAAGAACAGGAAAGAAACTGCGCAAGGCTTGGAG	40
XYL1 W89A Rv	CTCCAAGCCTTGCGCAGTTTCTTTCTTCTTCTTGACAAC	40
XYL1 Y139A Fw	CGAAAGCCAACAATCTCAAACAAACGCTCAGTTCATAGCAAAAAC TTGTGTC	52
XYL1 Y139A Rv	GACACAAGTTTTTTGCTATGAACTGAGCGTTTGTGTTGAGATTGTTG GCTTTTCG	52
XYL1 V169A Fw	AGCTTACCAGAAAAAGTTGCATTCTATTTGGAAGGCCCG	39
XYL1 V169A Rv	CGGGCCTTCCAAATAGAATGCAACTTTTTCTGGTAAGCT	39
XYL1 Y171A Fw	TAGCTTACCAGAAAAAGTTGTATTGCTTTGGAAGGCCCGTCAC	44
XYL1 Y171A Rv	GTGACGGGCCTTCCAAAGCGAATACAACTTTTTCTGGTAAGCTA	44
XYL2 W85A Fw	CAGAACGCACGCAGAACGCGAACGGTATTCAGCAAG	36
XYL2 W85A Rv	CTTGCTGAATACCGTTTCGCTTCTGCGTGCCTTCTG	36
XYL2 Y135A FW	AAAATCCAAATCAACGTGATCAAGCCATTGGCATTTCCTACTGTGC AAG	48
XYL2 Y135A Rv	CTTGACAGTGGAAATGCCAATGGCTTGATCACGTTGATTGTTGAT TTT	48
XYL2 V165A Fw	TTCTGCATCGCGGGTAGCCATTTACATCGAAGGTC	35
XYL2 V165A Rv	GACCTTCGATGTAAATGGCTACCCGCGATGCAGAA	35
XYL2 Y167A Fw	GTTCTGCATCGCGGGTAGTCATTGCCATCGAAGGTCCA	38
XYL2 Y167A Rv	TGGACCTTCGATGGCAATGACTACCCGCGATGCAGAAC	38
XYL3 W98A Fw	GACTAACCGAACACAGACAGCGATGGGTCCAGCACAAATG	40
XYL3 W98A Rv	CATTTGTGCTGGACCCATCGCTGTCTGTGTTTCGGTTAGTC	40
XYL3 W143A Fw	CGCACTTGGTATCGATAGCCAAGCGGTAAATGGAGGACAG	40
XYL3 W143A Rv	CTGTCTCCATTTACCGCTTGGCTATCGATACCAAGTGCG	40
XYL3 L173A Fw	TGAGAAGAACCCATCTAAGGCTGCGGTTTACGTTCAAGGCC	41
XYL3 L173A Rv	GGCCTTGAACGTAAACCGCAGCCTTAGATGGGTTCTTCTCA	41
XYL3 Y175A Fw	AACCCATCTAAGGCTTTGGTTGCCGTTCAAGGCCCTTCTTC	41
XYL3 Y175A Rv	GAAGAAGGGCCTTGAACGGCAACCAAAGCCTTAGATGGGTT	41
XYL1 Rv STOP	GGTACCTCATTCGCGGTGGATG	22
ChkE8SBD2Fw	ATAATCTCAATTATATCCGTA	21
ChkE8SBD2Rv	TCATATTTTCTTCCTCTAAC	20
ChkE8GFPFw	ATTATATCCGTATTATTCCTC	21
ChkE8GFPRv	GTCTTGTTAGTTGCCG	15

Tabla B-2 Oligonucleótidos

**Detalle de técnicas:****Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

El protocolo general de amplificación consto en un ciclo de desnaturalización inicial de 94°C por 4 min., un número determinado de ciclos: fase de desnaturalización 30 s. a 94°C; fase de hibridación a la temperatura óptima para cada juego de cebadores determinado por gradiente de temperatura; fase de elongación 1 min. por cada 1000 pb a amplificar, a 72°C, más una extensión final de 7 min. De esta forma el número de ciclos se estableció en función del objetivo buscado en cada experimento.

### Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Para la visualización de los productos de las reacciones de PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,0 - 1,5% (dependiendo del tamaño del fragmento) en Buffer TBE 1X, con el agregado de bromuro de etidio (5 mg/ml). La identificación de los productos se llevó a cabo por comparación con marcadores de masa molecular adecuados (100 pb, 400pb; Lamda Ladder PB-L Productos Bio-LogicosR).

### Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Para esta técnica se utilizó el kit GFX (GFX PCR and Gel Band Purification Kit, Amersham). Luego de la electroforesis en gel de agarosa, se cortaron las bandas conteniendo los fragmentos de ADN a purificar y se transfirieron a un microtubo. Se agregaron 500 µl de solución de captura y se incubó a 50°C por 10 min. hasta la completa disolución de la agarosa. Luego, se transfirió la solución con el ADN a la columna de purificación y se mezcló por pipeteo (de cuatro a seis veces). La columna fue centrifugada en una microcentrifuga a 12000 g por 30 s., y luego de descartar el fluido que traspasó al tubo colector fue reubicada en otro tubo. Se agregaron 500 µl de solución de lavado y se repitió el paso de centrifugación a máxima velocidad por 30 s. El tubo colector fue descartado y la columna fue ubicada en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml. Se agregaron 50 µl de buffer de elución directamente sobre la matriz de fibra de vidrio en la columna GFX. Se incubó la muestra a temperatura ambiente durante 1 min. y se centrifugó a 12000 g por 1 minuto para recuperar en el eluido el ADN purificado.

### Clonado de fragmentos de ADN con extremos cohesivos

Ligación a pET32c: El protocolo de la ligación fue el siguiente:

<b>Fragmento PCR purificado 50ng (5 µl aproximadamente)</b>	
pET32c	1 µl
Buffer de ligación rápida 2X	7 µl
T4 ADN Ligasa (Promega)	1 µl
Volumen final	14 µl

**Tabla B-3 Protocolo de ligación con extremos cohesivos**

Esta mezcla fue incubada por 2 h a temperatura ambiente

### Clonado en vector de expresión

Los vectores de expresión permiten la síntesis de grandes cantidades de proteínas codificadas en un gen de interés. Los mismos constan de un promotor fuerte e inducible, señales de iniciación



de la traducción (e.g. sitios de unión al ribosoma, RBS), sitios de múltiple clonados (MCS), y secuencias que permiten la regulación de la replicación y el control del número de copias en las células hospedadoras.

El vector pRSFDuet-1 (Novagen) es un vector de expresión diseñado para la co-expresión de dos genes de interés, mediante dos MCS. Cada marco abierto de lectura se encuentra precedido por un promotor T7lac y un RBS. El vector posee el replicón pRSF1030 (también conocido como NTP1), el gen lacI y un marcador de resistencia a Kanamicina. Este sistema hace uso de la ARN polimerasa del bacteriófago T7, una enzima muy activa y procesiva que tiene una alta selectividad para iniciar la transcripción en sus propias secuencias promotoras (Studier, y col., 1990). El ADNc de interés es inicialmente clonado empleando un hospedador que no contiene el gen de la T7 ARN polimerasa, eliminando así la inestabilidad del plásmido provocada por la producción de proteínas potencialmente tóxicas. Luego, se transfiere a un hospedador de expresión que contiene una copia del gen de esta enzima bajo el control de un promotor inducible por IPTG o lactosa (lacUV5). Estas cepas se distinguen por la presencia de la demarcación DE3 en su nombre.

La cola de hexa-histidina codificada en estos vectores permite la purificación de la proteína de fusión por cromatografía de afinidad mediante el uso de una matriz cargada con iones  $\text{Ni}^{2+}$ . Así, la proteína recombinante puede ser purificada casi a homogeneidad del extracto bacteriano en un único paso.

Esta tecnología, permite obtener cantidades suficientes de proteína para su posterior caracterización fisicoquímica, y bioquímica.

En estos casos, la reacción de PCR se lleva a cabo utilizando la enzima Taq polimerasa Q5 (Q5 High-Fidelity DNA Polymerase; New England Biolabs), enzima con mayor procesividad que la Taq Polimerasa (GoTaq, Promega). El producto de PCR fue chequeado por electroforesis en geles de agarosa 0,8% (p/v) y el tamaño del fragmento amplificado fue comparado con el marcador de tamaño molecular Ladder 100 PB (PB-L Productos Biológicos); Todos los fragmentos amplificados presentaron la longitud esperada. Posteriormente, los fragmentos amplificados fueron purificados mediante el ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) según las indicaciones del fabricante, y reamplificados con un numero de ciclos no mayor a 25, utilizando la enzima GoTaq polimerasa. De esta manera, los fragmentos presentaron una cola polyT en los extremos 3', esencial para el siguiente paso de clonado.

### **Preparación de células competentes de *E. coli***

Las células *E. coli* XL1-Blue MRF<sup>+</sup> (recA<sup>-</sup>) o células *E. coli* DB3.1 (resistentes a ccdB) fueron estriadas en una placa LB-Tet o LB-Estreptomicina respectivamente y fue incubada durante toda la noche a 37°C. Se inoculó una colonia en 2 a 4 ml de medio adecuado, LB, y se incubó durante toda la noche a 37°C, con agitación. Al día siguiente, se tomaron 0.50 ml que fueron llevados a 100 ml con LB. Se incubó durante 3 h a 37°C con agitación hasta densidad óptica (O.D.) a 600nm = 0,30–0,40. Después de separar en dos fracciones de 50 ml en tubos estériles, se centrifugó a 4000 rpm por 10 min. a 4°C. El precipitado de células fue resuspendido en 12.5 ml de 0.1 M MgCl<sub>2</sub> frío, y posteriormente centrifugado a 4000 rpm por 3 min. a 4°C. Luego se resuspendió en 12.5 ml de 0.1 M CaCl<sub>2</sub> frío, e incubados durante 30 minutos a 4°C. Se centrifugó a 4000 rpm por 3 minutos a 4°C, y después se resuspendió en 2 ml de 0.1 M CaCl<sub>2</sub>. Las células se utilizaron en el momento o fueron fraccionadas y guardadas a -80°C.

### **Transformación de células de *E. coli***

Las transformaciones se realizaron en 200 µl de células competentes de *E. coli* (cepa correspondiente) con 50-150 ng de ADN plasmídico, se incubaron durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente, se incubaron las células a 45°C durante 45 s y se enfriaron rápidamente en hielo por 15 min. Se agregó 800 µl de Medio LB y se incubó 60 minutos a 37°C. Se esparcieron 200 µl de la suspensión celular en placas LB-Amp conteniendo IPTG (100 µl de una solución 0.1M) y X-gal 50mg/ml. Las placas fueron incubadas toda la noche a 37°C.

### **Análisis de transformantes por PCR de colonia**

El análisis de las colonias crecidas luego de la transformación se realizó mediante PCR de colonias. En este caso, se colocó directamente una colonia dentro de cada tubo de reacción junto al resto de los componentes del medio; el programa de temperaturas utilizado y el análisis de los productos fueron similares a los ya descritos.

Aquellas colonias en las que se pudo observar un producto de PCR del tamaño esperado, se utilizaron para inocular entre 3 y 10 ml de medio LB conteniendo el antibiótico adecuado. Luego de la incubación a 37 °C durante 16 hs, se extrajo el ADN plasmídico.

### **Obtención de ADN plasmídico a mini escala**

Diferentes cultivos de 5 ml de LB y el antibiótico correspondiente fueron crecidos a partir de colonias individuales durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se centrifugaron 1 minuto a

máxima velocidad. Después de retirar el sobrenadante, se resuspendió el precipitado con el agregado de 200 µl de solución P1 (50 mM Glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) y agitación con vórtex. Se adicionaron 300 µl de solución P2 (0.2 N NaOH, 1% SDS) y se mezcló por inversión, hasta clarificar. Posteriormente los tubos fueron incubados 5 minutos en hielo, mezclando a los 2.5 minutos. Se agregaron 300 µl de 3M KAc pH 4.8 y se mezcló rápidamente por inversión hasta que los grumos se repartieron homogéneamente en todo el tubo. Seguidamente, los tubos fueron dejados en hielo durante 5 minutos, mezclando a los 2.5 minutos y centrifugados a máxima velocidad durante 15 minutos. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo, al que se le agregó 5 µl de ARNasa 10 mg/ml, y se incubó 30 minutos a 37°C. Finalmente se adicionaron 400 µl de cloroformo, se agitó por inversión y se centrifugó a máxima velocidad durante 5 minutos. Luego, 730 µl de la fase superior fueron transferidos a otro tubo, sin tomar la interface. El ADN fue precipitado agregando 700 µl de isopropanol. Se mezcló por inversión e incubó en hielo durante 25 minutos. Después de centrifugar 25 minutos a máxima velocidad y de descartar el sobrenadante, se lavó el precipitado de ADN con 500 µl de etanol 70% V/V (centrifugación 5 minutos a máxima velocidad). El sobrenadante fue descartado y el precipitado se secó por 5 minutos a temperatura ambiente. El ADN fue resuspendido en 30 µl de agua Mili Q.

### Reacciones de restricción con endonucleasas

Las reacciones con enzimas de restricción se realizaron agregando 0.2-1.5 µg de ADN como sustrato y exceso de enzima (de 2 a 10 veces respecto al ADN). La mezcla de reacción se preparó según:

Componente	Cantidad
Agua	1.5 µl
Buffer 10x	1.5 µl
BSA (10 µg/µl)	1.0 µl
ADN (1µg/µl)	10.0 µl
Enzima de Restricción (10 u/µl)	1.0 µl
Volumen final	15.0 µl

**Tabla B-4 Protocolo de restricción con endonucleasas**

La mezcla de reacción se incubó 1 hora a 37°C.

### Expresión y purificación de proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes fueron expresadas en células de *E. coli* BL21 (DE3) RIL. Luego de ser crecidas las células por 4 h a 37°C se agregó IPTG a concentración final 0,5 mM en el medio de cultivo y este fue incubado por 4 h a 28°C. Las células fueron precipitadas por

centrifugación 10 minutos a 4000 g a 4°C. El precipitado fue lavado y resuspendido en buffer conteniendo 20 mM Tris-HCl, pH8 (1 ml/g de célula). Las células se rompieron utilizando un ultrasonicador (VCX130, Sonics and Materials Inc., Connecticut, USA) y posterior centrifugado a 1200 g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue filtrado a través de filtro de membrana de acetato de celulosa y cargado a una columna HiTrap TM Chelating HP (Amersham Biosciences) equilibrada con buffer de unión (20 mM Tris-HCl pH 8, 0.3 M NaCl, 1 mM  $\beta$ -mercaptoetanol; 20 mM imidazol). Este paso fue llevado a cabo a 25°C. La columna fue lavada con 10 a 15 volúmenes de buffer de unión, cada proteína fue eluída usando un gradiente lineal de buffer de elución (20 mM Tris-HCl pH 8, 0.3 M NaCl, 1 mM  $\beta$ -Mercaptoetanol; 0-500 mM Imidazol). Todas las proteínas eluyeron en la fracción 200 y 300 mM de Imidazol. Las fracciones conteniendo la proteína fueron unidas y concentradas a >1mg/ml usando concentradores Centriplus-10 y Centriprep-10 (Millipore Corp., Massachusetts, USA). La proteína concentrada fue guardada a -20°C hasta su uso en ensayos de unión a distintos sustratos.

Las proteínas obtenidas en la fracción insoluble de los extractos celulares de *E. coli*, las proteínas fueron extraídas a partir de la resuspensión del precipitado en 10 ml de buffer desnaturalizante (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4; urea 8M) e incubación con agitación durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron a 10000 x g durante 30 min a temperatura ambiente. La fracción de proteínas solubilizadas provenientes de las células transformadas se sembraron en una columna de 1 ml cargadas con  $\text{Ni}^{+2}$  como ligando (Hi Trap chelating HP, GE Healthcare Bio-Sciences). La columna se lavó con 20 ml de Tris-HCl 20 mM, pH 7,4; urea 8M, imidazol 20 mM y la proteína recombinante se eluyó por gradiente de imidazol (20-500 mM) en Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 conteniendo urea 8M. Las fracciones con la proteína pura, se desalaron mediante intercambios sucesivos de buffer, en un Amicon Ultra-15 (Millipore) (8-0 M) en Tris-HCl 20 mM, pH 7,4; NaCl 500 mM, glicerol 20% (V/V). La presencia de las proteínas recombinantes se analizaron por SDS-PAGE al 10% y western blot.

### **Cuantificación de proteínas**

La totalidad de las proteínas fue determinada por el método de Bradford en el cual se tomaron concentraciones crecientes conocidas de la proteína albumina de suero bovino (BSA) con las cuales se realizó una curva de calibración para luego mediante la medida de absorbancia a 590nm determinar por interpolación la concentración de las proteínas totales (las curvas de calibración serán mostradas en resultados).

## Electroforesis y detección inmunológica

El análisis de electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) fue llevado a cabo con un equipo Mini Protean (Bio-Rad) usando geles de poliacrilamida/bisacrilamida al 10% o 15% (según el tamaño de la proteína a separar) como ha sido previamente descrito por Laemmli, 1970. Los geles fueron revelados por tinción con *Coomassie Brilliant Blue* (R250, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) o mediante la transferencia a membrana de nitro celulosa (Trans-Blot Transfer Medium, Nitrocellulose Membrane, Bio-Rad, California, USA), y posterior revelado con anticuerpo penta-His (Anti-His antibody selector kit, Qiagen, California, USA) o anticuerpos policlonales obtenidos en conejo contra ADP-Glucosa Pirofosforilasa o SBD23 de SSIII de *Arabidopsis thaliana*, ya disponibles en el laboratorio. El complejo antígeno - anticuerpo fue visualizado por la reacción de la fosfatasa alcalina unida a anticuerpo anti IgG de ratón o anti IgG de conejo con los sustratos BCIP y NBT (Promega, Madison WI, USA).

## Ensayos de unión de las proteínas recombinantes a distintos sustratos

Se utilizaron distintos adsorbentes (almidón, pectina, xilano y celulosa micro cristalina) al 10% (p/v) en buffer fosfato-citrato pH 5, a los cuales se los incubo con concentraciones crecientes de proteína purificada (30-40-50-60 mg), realizando los respectivos controles (Kerk, y col., 2006). Posteriormente se mantuvo en agitación continua por 12 h a 4°C, se centrifugo a velocidad máxima en centrifuga refrigerada (4°C) durante 5 minutos. Se tomó el sobrenadante al cual posteriormente se le determino la absorbancia de proteína a una longitud de onda de 280 nm. El valor de  $K_{ad}$  (constante de adsorción) se determinó según la pendiente de la relación de miligramo de proteína libre versus miligramo de proteína unida por gramo de sustrato (Guillen, y col., 2007).

## Transformación de *Arabidopsis thaliana* por “Floral Dip”

Se crecieron plantas de *A. thaliana* variedad Columbia (Col-0) hasta floración (aproximadamente 4 semanas). El momento adecuado para la transformación de las plantas por inmersión de los botones florales (Clough y Bent, 1998) es cuando las yemas están emergiendo (aprox. 2 cm. - 8 cm. de la roseta) y todavía no se encuentran flores abiertas. Las plantas se regaron abundantemente los dos últimos días. Previamente a la transformación de las plantas, se inoculo 30 ml de medio LB conteniendo, Rifampicina (100 µg/ml), Gentamicina (25 µg/ml) y Spectinomycin (100 µg/ml) con *Agrobacterium tumefaciens* portadores de la construcción de interés: *pCTAPi.298* (Rohila, y col., 2004) + *E8At-SBD123* a continuación del promotor constitutivo 35S CaMV. Estos inóculos fueron crecidos con agitación a 28°C por 24 h, los

cuales fueron utilizados como pre inóculo en 600ml de medio LB suplementado con antibióticos, que fueron crecidos con agitación a 28°C por 24 h. Los cultivos saturados se centrifugaron a 4200 rpm por 15 minutos. El precipitado bacteriano se resuspendió en un litro de medio de infiltración, el cual contiene 50 g. sacarosa, 0.5 g. de buffer MES y 300 µl de Silwet L-77R (Helena Chemical Company). Se llenaron vasos de precipitado con la solución de *Agrobacterium* resuspendidos en medio de infiltración. Las plantas fueron invertidas sobre la solución de infiltración bacteriana de modo de que quedaran sumergidas totalmente en el líquido, incluida la roseta. El tiempo de inmersión fue de 20 a 30 segundos y posteriormente al retirarlas, fueron puestas de costado en una bandeja, para que el exceso de líquido no penetre en la tierra. Luego se cubrió la bandeja que contenía las macetas con papel film y siguieron su crecimiento en el cuarto de plantas por 1-2 días. Cuando las flores se abrieron y las yemas comenzaron a crecer, las macetas se colocaron en posición vertical. Se dejaron crecer las plantas hasta la apertura de las silicuas con una irrigación decreciente. De esta manera se obtuvieron las semillas de la generación parental de plantas transformadas (E8-SBD123) que se recolectaron en un papel, se tamizaron los restos de los frutos y se guardaron las semillas en tubos de microcentrifuga destapados hasta que se encontraron libres de humedad para evitar la contaminación de las semillas. Posteriormente los tubos conteniendo solo semillas secas fueron tapados y mantenidos en heladera a 4°C hasta su utilización.

### **Esterilización y siembra de semillas**

Para aproximadamente 250 µg de semillas, se agregó 1 ml de solución de lavandina al 5% y detergente Tween 20 0.05% en agua destilada estéril. Se agito con vórtex por 7 min. y se centrifugo, descartando posteriormente el líquido sobrenadante. En condiciones estériles se realizaron tres lavados con agua destilada. Se prepararon placas de Petri con medio MS y MS con Kanamicina (marcador de selección de *A. tumefaciens*) para las de tipo salvaje y transformantes, respectivamente. En flujo laminar, las semillas fueron tomadas una a una mediante pipeta y se depositaron sobre las placas. Se dejó secar las placas en el flujo hasta que el agua se absorbió para evitar que las semillas se movieran en el traslado. Seguidamente las placas envueltas en papel film fueron colocadas en cámara fría por 3 días (para inducir la vernalización y aumentar el porcentaje de germinación y floración temprana). Transcurrido este periodo de tiempo fueron llevadas al cuarto de plantas. Los cotiledones de las plantas sensibles (no resistentes a Kanamicina) se tornaron amarillos mientras que las transformantes permanecieron verdes. Una vez que las plantas sacaron hojas verdaderas se las rustico en macetas conteniendo tierra, perlita y vermiculita (3:1:1 v/v) y el riego se realizó con solución Hogland al 50% en agua. Las plantas fueron crecidas bajo las condiciones de fotoperiodo

previamente mencionadas. Cuando el desarrollo reproductivo de las plantas lo permitió, se cosecharon sus semillas obteniendo de esta manera la primera generación filial (F1) de plantas transformadas (E8-SBD123) de *A. thaliana*.

### **Clonado de fragmentos de ADN a través de tecnología Gateway**

La tecnología Gateway es un método de clonado universal que tiene la ventaja de los sitios específicos de recombinación propios del fago lambda, esto provee un rápido y eficiente método para mover fragmentos de ADN en múltiples sistema de vectores. La reacción *attB* x *attP* es mediada por la enzima Gateway BP Clonasa II, la reacción *attL* x *attR* es mediada por la enzima Gateway LR Clonasa II, *ccdB* es el gen de toxicidad que inhibe el crecimiento en *E. coli* y “gen” representa el segmento de ADN de interés (ej. Producto de PCR, ADNc, ADN genómico)

### **Obtención de ADN genómico de plantas**

El ADN genómico se extrajo de acuerdo al método del CTAB. Se agregaron 200 µl de buffer CTAB en un tubo de microcentrifuga. Seguidamente se introdujo 100 mg de material vegetal dentro el tubo, el cual fue triturado con un embolo plástico hasta su completa desintegración. Se adicionaron 100 µl más de buffer CTAB y se incubo a 60°C por 30 minutos. Luego se agregaron 300 µl de cloroformo, se mezcló y centrifugo por 5 minutos a 12000 g. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se agregó igual volumen de isopropanol. Se incubo 20 minutos a temperatura ambiente (para la precipitación del ADN) y luego se centrifugo 10 minutos a 12000 g. El precipitado conteniendo el ADN se lavó con etanol al 70% V/V. Luego de secar al vacío, el precipitado fue resuspendido en 20 µl de agua estéril.

### **Extracción de ARN**

Para la extracción del ARN vegetal se utilizó el kit comercial TRIR Reagent (SIGMA) según el siguiente protocolo: Se homogeneizo la muestra con nitrógeno líquido, según la relación 100 mg de tejido: 1 ml de TRIR Reagent. Posteriormente se agregaron 200 µl de cloroformo y se agito vigorosamente de forma manual durante 15 segundos. Se dejó reposar durante 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugo a 12000 g durante 15 minutos a 4°C. Luego de esta etapa, se observan dos fases en la mezcla dentro del tubo; una inferior orgánica, de color rojo y otra superior, acuosa e incolora, de donde se recuperó el ARN. Se transfirió la fase superior a otro tubo y a esta se le agrego 188 µl de alcohol isopropílico. Luego de agitar por inversión, se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugo a 12000 g durante 10 minutos, a 4°C y se descartó el sobrenadante (el ARN se deposita como precipitado en el fondo del tubo). Se lavó exhaustivamente el precipitado con etanol 70% y se agito con

vórtex durante 2 minutos. Se centrifugo a 7000 g durante 5 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. El ARN se resuspendió en agua tratada con DEPC (di-etil-pirocarbonato, para la inactivación de ARNasas). El material así obtenido está en condiciones de ser procesado por RT-PCR.

### Reacción de retro-transcripción

A fin de sintetizar ADNc, el ARN total obtenido fue cuantificado espectrofotométricamente y procesado según el siguiente protocolo:

Reactivo	Volumen
Buffer 5X (Tris-HCl, KCl, MgCl <sub>2</sub> , DTT)	10.0 µl
dNTPs (10 mM)	2.5 µl
Hexámeros (2 µg / µl)	0.3 µl
ARN	3.0 µg
Inhibidor de ARNasas	2.0 µl
H <sub>2</sub> O DEPC	22.5 µl
MMLV (200 unidades /µl)	2.5 µl
VOLUMEN FINAL	50µl

**Tabla B-5 Protocolo para la reacción de retrotranscripción**

Por último, esta mezcla de reacción se incubo durante 60 min. a 42°C y luego 15 min. a 70°C para detener la reacción. Una vez terminada la retro-transcripción se realizó una PCR cuyo protocolo fue diseñado según el tamaño del fragmento a amplificar para cada una de las construcciones y genes de interés.

### Selección de plantas transformantes E8-SBD123

Con el objetivo de seleccionar las plantas portadoras del transgen se utilizó el método descrito por Mengiste y colaboradores (Mengiste, y col., 1999). En el mismo, se utiliza el herbicida comercial Basta® Bayer (el cual es el marcador de selección de las plantas portadoras del transgen) en una concentración de 25mg/l. Las plantas se rociaron tres veces en intervalos de 5 días desde la aparición de los cotiledones y por observación del fenotipo senescente de las plantas tipo salvajes comparado con las transformadas (verdes y vitales) estas últimas fueron fácilmente seleccionadas. Posteriormente se confirmó la presencia del transgen a través de una PCR sobre ADN genómico con los cebadores GtwUpE8At y D2 Down, utilizando como control plantas no transformadas, y visualizando los fragmentos amplificados en geles de agarosa.



## Ensayos de unión a polisacáridos

La adsorción de los CBM a los distintos polisacáridos, fue determinado como ha sido descrito anteriormente, con ligeras modificaciones (Rodríguez-Sanoja, y col., 2005). Proteína recombinante pura (concentración final de 0-80  $\mu$ M) fue agregada a una suspensión de polisacáridos pre lavada (10%, P/V) en un buffer citrato-fosfato 100 mM (pH 5) hasta un volumen final de 60  $\mu$ L. Cada mezcla fue incubada a 4°C al menos 1h en agitación suave (10 rpm), y luego centrifugado a 12000 g por 5 min a 4°C. Para calcular la cantidad de proteína unida, la cantidad de proteína presente en el sobrenadante fue sustraída del total de proteína agregada a la mezcla. La concentración de proteína fue determinada mediante su absorbancia a 280 nm. La constante de adsorción ( $K_{ad}$ , en ml/g) fue determinada según (Rodríguez-Sanoja, y col., 2005), a partir de tres réplicas biológicas, de acuerdo con la sección de análisis estadístico.

## qRT-PCR análisis

Los ensayos de qRT-PCR fueron llevados a cabo en un equipo MiniOPTICON2 (BioRad, Hercules, CA, USA), utilizando el fluoróforo SYBRGreenI (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), y GoTaq polimerasa (Promega, Madison, WI, USA). Los cebadores para realizar estos ensayos (ver apéndice), fueron diseñados utilizando el software en línea PrimerBlast (Ye, y col., 2012). Los ciclos de amplificación fueron definidos de la siguiente manera: Desnaturalización 2 min a 94 °C; 40 ciclos a 94 °C por 10 s, 63 °C por 15 s, y 72 °C por 20 s, seguido de 10 min de extensión a 72 °C. Tres réplicas técnicas fueron llevadas a cabo por cada réplica biológica. Las curvas de desnaturalización (“melting”) fueron determinadas utilizando una disminución de la fluorescencia a partir de un incremento de temperatura (de 65 a 98 °C). Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, para confirmar el tamaño y especificidad de la reacción. Los niveles de transcritos relativos fueron calculados como la relación de la abundancia del transcrita en relación al transcrita del gen control  $\beta$ -ACT (At3g18780). Los nombres completos de los genes se encuentran en las Tablas 1 y 2 del Anexo I.

	Nombre	Acc. N°	Cebador 5'	Cebador 3'
Control	ACT2	AT3G18780	TGCTGGAATCCACG AGACAACCTA	TGCTGAGGGAAGCAAGAA TGGAAC
	UBC21	AT5G25760	GACTCCTTACGAAG GCGGTGTTTT	GCTCAGGATGAGCCATCA ATGCTA
	CBP	AT5G44200	CCGGCCTATTCGTG TGGATTTTGA	CATAATTTCGTTGGCGCAG CTTGAG

	AGL15	AT5G13790	TTCTCCCGTCGTTC ACCCACTA	CCTCTCCCGGCAACCCTA ATTG
	CESA1	AT4G32410	CGTTTTGGTCAGTC GCCGGTA	AGATCCAACCAATCTCTT TGCCCC
	CESA2	AT4G39350	TCTCCGGTTTTTCGT TGCCTCTG	TCCACCCGATCTCTTTTC CCCA
	CESA3	AT5G05170	AGAGGGAGTTGAAG GTGCTGGT	TGGAGTTGCTGAAGGAGG AACAC
	CESA4	AT5G44030	GTGGTATGCTTGGG GAGGCAA	TGCTTGCGAAATTGTTGA TCGTAGG
	CESA5	AT5G09870	TGCTGGCCTAAGTG GTGTTTGT	TCGCCGCATCATTAGTGC CTTT
	CESA6	AT5G64740	GCTGGCCAAAATGG TGTCTCCT	ACGTTAGAACCTTTAGTG ACGCGG
	CESA7	AT5G17420	TAGCAGCCCTTGGA GGAGCA	AGCACTGCAGGACTTGAT GACG
	CESA8	AT4G18780	TCATCCCAACGCTA TCAAACCTAGC	ACGGCAAAGAGATGAGCT GAGAC
	CESA9	AT2G21770	AGGCCTTCAAGTGA CAAATGCTGA	ACGCTGGGTTACATTGC TAGG
	ATEXPA2	AT5G05290	GCATTGAGAAAGGT TCCATGTGAGA	GCCACTGATCTGTCTTTG AGCCT
	ATEXPA8	AT2G40610	CACCATGGGCGGAG CTTGTG	CCACCTCGGGTCATCGTT ACAC
	ATEXPA9	AT5G02260	ACCGCAGGATCCCA TG TAGGAA	TCCCCAGTTCCGGCTCAG AT
Pared Celular	ATEXPA1 0	AT1G26770	ACAATGGGTGGTGC TTGTGGAT	CGGTTACAACGATTGAGC CAGGT
	ATEXPA1 1	AT1G20190	TCCCGTCGTTTTCC AAAGAGTAAGC	GGCTAACCAACCAGTCTT TGATCCT
	ATGH9C2	AT1G64390	GTGGCCCTGATGCT TACGACAA	GGAACCACTGGAAGAAAC TGGCT
	XETG	AT2G14620	CCTCAGATCAGCCT AACCGGGA	GTGTGAAAGTCCTTGGCT GGGT
	RXF12 (ATXN1)	AT1G58370	ACCCATCTAAGGCT TTGGTTTACGTT	ACGTCACGCTTACGGATC TTGTC
	XT1	AT3G62720	CTCAGGAACCTACA GTGGTCGC	ACCATCGCCGATTGATCG TCAG
	XT2	AT4G02500	TGATACTTGGGCTC CCATGGGT	AGGTACACCTTATTGCCC CAAGC
	MUR3	AT2G20370	CCTTGTGGCGGGTA GGATAACG	AGTAGGTTGGGTACGGGA TCCC
	XGD1	AT5G33290	CAAGCCCATCACCT CTGTCGAA	CAATCACGTCTGGTGCCC AGT
	AT3G4218 0	AT3G42180	TCGCCAGCCGATTT CAACCGGGC	TCGGGAGCCCAATCGTGG CAAGAGA
	KOR1 (ATGH9A 1)	AT5G49720	CGTGACTTTGCTAG ATCCCAGATTGAT	CTCCATTTCCATCCTCCT TTGCAGT
	THE1	AT5G54380. 1	ACCGGCCTTCTATG GGAGATGT	CAAACGGTTCCATTGGCG CC
	FEI1	AT1G31420	TGGTAAGCTGCTGA	CACAATAGACGCACCTCC

		TTAGCGCA	ACCA
FEI2	AT2G35620	CTACATAAGAGAGG CGAGCAGCTG	TACCCGAGCCTCCAGATT TCCA
COBRA	AT5G60920	ACGCTGGACTAAAC GATACGGC	TCCTTCGTGGAAAAGCCC AACC
WAK1	AT1G21250. 1	TCAGCTGGTTGCCA AGACGTC	GCAAACCTCTTTACGCTTG CAGCT
WAK2	AT1G21270	ACCTTCCAAACGGT TGTCAAGACAT	CAGGCCTGACTTTACGAG TACAGC
ANX1	AT3G04690	ACGGCGGAGAAGTG TCTTAACG	CCTCAGAGCTTCCTCCAT TATTCGG
ANX2	AT5G28680	CAACGATGGGAGAT GTCTTGTGGAA	ACCCAAGTCACTTTCTCC GGC
PERK4	AT2G18470	CACCTTAGTAGATT GGGCTCGGC	TTTGGACGTTTACGCCCC GAAT
CAD6	AT4G34230	ATGCTTGGGAGGAA AGTGATAACGG	ACGCACATCGTTCTTCTC GAGTC
ATOMT1	AT5G54160	CGTCTTAACCTGCT CCAACCGT	ATGGTACCAGCTTTCCAT GAGAACC
4CL-1	AT1G51680. 1	GCCAAACTCGGTCA GGGATACG	CGAAAGAGAATCTCCGGT GTCTGG
4CL-2	AT3G21240	AGCTTGGTCAGGGC TATGGGAT	TGGATCAAGTATCTTCAT CTCGGCG
CCR1	AT1G15950. 1	AGCTTATGTGGATG TTCGCGATGT	CCTTGCACCTGGTCGGAA GAGG
CCR2	AT1G80820. 1	CCACCAAGTGTTG GACGAGAA	TCTTGAGGTAGAGGAAGA TGGCCTT
CCOMT	AT1G67980	TACGGAAATTTAAG CGAGATGGAGGTT	ACGGCCATCTTCAGGTAA AGCAA
XPC1	AT4G33820	GAGCTCAGGGTCAC TTTGGTCC	GTCTTCCACGTATTGCGC CTGA
XPC2	AT4G33810	GCCTAAGTGCCCTA ATCAGGAGGTA	TCTCCTGTTGCAGTGTTG TTGAAGT
UPB1	AT2G47270	GTCGCGCAATACAC AGACGAGT	TTCGGTCAAAACCTGAAC CATGTGCT
PER 39	AT4G11290	TCGTCTTGTTATCC GGTGCCCA	TCTCCGTGATTTGAGATT GTCGGC
PER 40	AT4G16270	ACCAAGGTGGGAGG TGGAAGTAG	GTATGTCCACCGGAAAGA GCGAC
PER 57	AT5G17820	GGGATGAACACGTT CGATGCAGT	CCTTAGGCTGGTAACCAA AGCGG
PER 34	AT3G49120. 1	ATCTCGTTGCTCTC TCCGGTGG	TGCCATTAAGGGGGCATA GTCCA
PER 33	AT3G49110	TTCTCCGATGCTCA ACTTACCCCT	CGAAGCATCACAACCATT AACAAAGCA
SHY2	AT1G04240	CCTCAAGGAAACAG AGCTGAGGC	CATCCAACAATCTGAGCC TTTCGAGG
ARR1	AT3G16857	ACGGTGGTTTCAGTG AGGGTGAA	CCGGTGCAATCCCTTCCT GCTTA
HERK	AT3G46290. 1	TCTTCTTGGGAAGT TGCTTTGTGTTGT	AAAGGGAATACGGTAATT GGCATTGGT
AOP2	AT4G03060	ACTATGGCCTCATG	ACTTCATCAGTCGCATAC

	FIB	AT4G04020	GTGACGGT ATGGATCCTCGCCT ACACGTCG	GCCG TGTGGAAAACGGACCAGC GAAC
Almidón	GBSSI	AT1G32900	TCAGATGGTTATCC TTGGGACTGGA	GGCTCAAACCTGCTTGGG ACA
	SSI	AT5G24300	CGAGATTTCGAGCCC TGTGGTTT	GGGAGTGAAGACCCACCC TGTA
	SSII	AT3G01180	TAACATTGCTCATC AGGGGCGG	AACAGTGAGAACTCTATC CGCAGC
	SSIII	AT1G11720	GGTCTAGTGCTCCG GTTTCATGG	AGTTGGTGAAACCGTTGT GGCT
	SSIII (SBD123)	AT1G11720	CCTGCAAACACGGT TTTGAATGGAA	TGGGACCTTAGCCGTAGT CTTCA
	SSIV (SSV)	AT4G18240	AGTTCGAACAGCTG AGGGAGGA	GCGTTGAACTGAGCCTTG AGGA
	SBE 2.1 (SBE3)	AT2G36390	TTCACCTCTGATGG AAGGCACG	GGTAACAGGCCTATGGGG ACAAG
	SBE 2.2 (SBE2)	AT5G03650	TGGTAGCGTGATTC CTGGCAAC	GGTGCTCCGAAGTCATAA AACCGT
	AMY2	AT1G76130	GCAGGAAGCCGTAA AGGGTCAG	ACGGCCAATGAGCCTGAG TAGA
	AMY3	AT1G69830	GGGCAGTAGTTGCA GATGACCC	ACCCAACCTTCTTCCATCA TCCAGC
	DPE1	AT5G64860	CTATCGGAGCACCT GGAATGGC	CCACCAGCCTCGAATAGT GTCG
	DPE2	AT2G40840	GCTTGGTGGGAAGA GGACGAAG	GCCATCATATCCTGAAGC GGGAA
	PHS2	AT3G46970	ATCCTCGCATACGG TGAATGGC	TCAGGGCTGCAGAAACGT AACC
	GWD (SEX1)	AT1G10760	TTGATTTCGCCTCTG GTGTTGGG	GAGCACGACTTGGTCTTC CTCG
	PWD (GWD3)	AT5G26570	TTAGAGCGCGGCAG GAGAAAAT	TTGGAAGTGCGACTCCTA CCCT
		AT1G27070	GACGGTTGGTCTAC CCAGAGGA	GTAACAATGGGTCGAAGC GGGT
	ApS1	AT5G48300	TCAGAGAGCCAAGG AGATGCCT	GGTAAGCTTGCAACCCTCA GTCC
	ApL1	AT5G19220	TCTTGAGATGGCGT TTCCCCAC	AGTGAGTGCAAGATTCGC CTCG
	UGP	AT3G03250	AACTAACCCCTCGA ACCCGTCA	CCACAGTCACCTTGCCCT TGAG
	PGM	AT5G51820	GCTATCATCGCAGC CAATGCAC	TCCATCCAGTGGGAACCT CGAA
	PGSIP1	AT3G18660.1	*	*
		AT3G18660.2	TTACCTTGGGATGA AGCCGTGG	TGGTGAAGTTCTGTGGC ATGG
	LSF1	AT3G01510	AATGGACATGAGGG GGAGGAGG	GCTGAATGCCTCCAATCA CCGT
	SEX4	AT3G52180.1	TGACATTGGATGGG GACAGAGGA	AAACGGTTCGGCCTCATT GTGT

	AT3G52180.2	*	*
AT3G10940	AT3G10940	TCTGTGACATGAATCTTAACACGGCT	CCTCGAATGCGTTCTCAGGGAG
PII	AT5G39790	GGATTGGCATGGCAGAGAGTGT	GAACTTCATCTCGTACCGCCCG
DBE1	AT1G03310.1	*	*
	AT1G03310.2	TTGTGGGGAAGAAGGAGCAACG	CGTGATTCCAACAAAGGCGAGC
ATLDA	AT5G04360	ACTGGCCACTGATCAAACCGAG	CGCTCCTGTATAGCCCTTGCTG
HXK1	AT4G29130	CAGCCTATGTTGAGCGTGCAAC	TTTCTCAAGAATCTGTTCGCCTGGA
HXK2	AT2G19860	ACCATTTCATCATAAGGACCCCGAAC	GAGCTCCTCGGCTTGCAATGAT
PGIC	AT5G42740	GTGGGGCGTTGAGCTAGGAAAA	GGGCTCGGAACCTTGTCTCGAG
PGI1	AT4G24620	CGTTGTTCATGCTCTGAGGAAATAGA	TCCACATTGCACTCGCCCAAT
PEPC1	AT1G53310	ACGGTATGCGTCCTCCAATTTTCG	CCGGTGTAGCGAGGCGGAC
PEPC2	AT2G42600	CCTCCAGGTTGCAGGTCACAAAG	CGTGGAAGCTTGGGTCACGG
PKc1	AT3G52990	TCGTCAACCCTGCGGAATCTACA	GCGAGGCAAAAGTTAATCTCAAGCT
PKc2	AT2G36580	ATCCTCGTCACCCTGCGGAA	CACGGACGCATCTCCCATTTTC
PFK1	AT4G29220	ATGGGACGGTACAGCGGATTCA	ACCATATGACCACTCTCCTTTAACCGT
PFK4	AT5G61580	GATACGGCGGTTGAGGAAGCAC	GCAACAATCCACATCACGATTCGC
PFP $\alpha$ 1	At1g20950	GGCAAAGCATACGACCTCTTGAGAC	CCTGCAGCTTCTTGATACGTCCC
PFP $\beta$ 1	At1g12000	GGCTGCTCCTGTGGAAGAATGG	ATTGGATCGGACCTGGGCTGAT
FBP	AT1G43670	CAGGGGAAACAAACATTCAGGGTGA	GGCTCCACAAACGTAGCTTCCTC
CFBP1	AT3G54050	AGTTACTCCGGCAACTACGTCGT	ACCCAAGAGCTGAGATATCGTCGG
G6PD5	At3g27300	GGGTCTGGAGATGCAACCCGTG	TCCAAGCTGCCTTTAATTCGTCTC
SUS1	AT5G20830.1	AAGTATCGCCCATGGCTCAGG	TGCGCTTCCCAATCCGAATGAT
	AT5G20830.2	*	*
SUS3	AT4G02280	GCTTTTGCTCAGCCTGCGTTC	ATCGATGTGGAAACCCGAGAGC
SUS5	AT5G37180	CTGGAAGCAAAGAGAGGGCTGG	CGGTCTTGTCGGTAAAGGA
ATSPS3F, SPS3	AT1G04920	TCATAGGGCATTGCAACCGGT	AGGTAAGTCCGGCAATGCTCAG

	ISI1	AT4G27750	TCCTGGCTCATAAG CATGGTGC	CCATTGCAAGCTCCAAA TCCACC
	VAC-INV	AT1G12240	ACGCCGTGTCTAGG GACCTAAT	GTTTTGGACCTGCACCGC TTTG
	AtcwINV2	AT3G52600.1	TGGTGGAGTTGGTC CTTTTGGTT	ACTCGAAGGCTTGGCGTC AG
Transgen	E8-SBD123		CCTCCAAGGAAGTC ATGGAGACG	CGGGTTCGTTATTCAGAG TCGACA
	IPS1	AT4G39800	TCAAATCCGAGGGA GAGGGAAAGTT	GTCCAACGCACGCCCTCA TAAT
Biomasa	KRFP	AT1G23390	TGGTTTATGTACAT GGTGC GGCG	ACGATTACTCTCTCAGCC GCGT

**Tabla B-6 Oligonucleótidos utilizados para PCR en tiempo real.**

(\*) cebador hibrida sobre las dos variantes de empalme (“splicing”).

**Análisis de la expansión de la roseta.**

Utilizamos el método de determinación de la expansión de la roseta descrita por Rymen y colaboradores (Rymen, y col., 2010) con modificaciones. Las plantas fueron crecidas en suelo, como se indica arriba, e imágenes digitales fueron adquiridas a través del tiempo. Estas imágenes fueron procesadas con el programa ImageJ (Abramoff, y col., 2004), y el área total de la roseta fue determinada en cada punto. Finalmente, este parámetro fue graficado en función del tiempo y un ANOVA a dos vías fue realizado, definiendo dos factores con diferentes niveles: Tipo de planta (Col-0, E8-SBD123.1 and E8-SBD123.2) y tiempo (cada día como nivel)

**Análisis fenotípico del crecimiento**

Muestras de 10 plantas de 28 días fueron cosechadas para la determinación del peso fresco. Luego, las muestras fueron secadas a 60°C hasta peso constante para la determinación del peso seco. El parámetro materia seca (DM) es calculado como el cociente PS/PF (kg kg<sup>-1</sup>). El índice de calidad (QI) fue adaptado a *Arabidopsis thaliana* a partir de lo descrito por Ritchie y colaboradores (Ritchie, 1984) como una medida global de fenotipo deseable. El mismo fue determinado como  $QI = ([RDW + SDW] / [SL / (RD / 10)]) + [SFW / RFW]$ , donde RDW es el peso seco de raíz, SDW es el peso seco de tallo, SL es la longitud de del tallo; RD es el diámetro de raíz; SFW es el peso fresco de tallo y RFW es el peso fresco de raíz. Los parámetros de crecimiento asociados fueron determinados según Hunt y colaboradores (Hunt, y col., 2002). LAR es la relación de área de hoja, SLA es el área de hoja específica, LMF es la fracción de masa de hoja, RMF es la fracción de masa de raíz, SMF es la fracción de masa de tallo. El contenido relativo de agua (RWC) fue determinado según Smart y colaboradores (Smart, 1974). La tasa de elongación de tallo (SEM) y la longitud del hipocótilo fue determinado según Weigel y colaboradores (Weigel y Glazebrook, 2002). Para la tasa de

elongación de raíz, las plantas fueron crecidas en placa y la longitud. Todos estos parámetros fueron determinados de manera individual para cada línea de planta y luego comparado estadísticamente, de acuerdo a la sección de análisis estadístico (6-48).

### **Determinación de intercambio gaseoso**

La sexta hoja fue diseccionada y colocada en una cámara transparente mantenida a 24°C, y luego gaseado continuamente con  $[CO_2]=600$  ppm, con humedad relativa constante de 56%. El gas fue bombeado secuencialmente a través de la cubeta a través de un detector de humedad relativa, un tubo de secado, y finalmente un IRGA (Qubit Systems Inc., Kingston, Ontario, Canadá). El flujo fue monitoreado y mantenido a 1 ml/s con un flujómetro de masa. La iluminación ( $115 \mu\text{mol quanta/m}^2/\text{s}$ , 620-750 nm) fue provista por una fuente de luz LED.

### **Observaciones por microscopía**

Las muestras para TEM fueron fijadas toda la noche en glutaraldehído 2.5% en buffer fosfato (0.1M, pH 7.4), y luego tratadas por 1h 30 min en tetraóxido de Osmio en buffer fosfato 1% (p/v). Luego, las muestras fueron teñidas con acetato de uranio en agua 5% (p/v), y deshidratadas gradualmente a través de una serie de soluciones de alcohol (50, 70, 90, 100 %), un paso por acetona (como mínimo 15 min por cada paso), y luego embebidas en resina de Spurr o DURUCUPAN. Secciones delgadas fueron cortadas con un cuchillo de diamante, y observadas con un microscopio Zeiss 109T (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) y una cámara digital GATAN (GATAN Inc., Warrendale, PA, USA). El espesor de la pared celular, fue determinada en células parenquimáticas de tallos de plantas de 28 días, utilizando el programa ImageJ (Abramoff, y col., 2004). Para obtener imágenes de las células del parenquima en empalizada, las hojas fueron fijadas con FAA y decoloreadas con hidrato de cloral, según es descrito en (Horiguchi, y col., 2005; Rodriguez, y col., 2010). Las células fueron observadas usando microscopía de contraste por interferencia diferencial (DIC) Olympus BH-2 (Olympus Corporation, Shinjuku, Tokyo, Japan) y una cámara digital Nikon digital Sight DS-Fi1 (Nikon Corporation, Tokyo, Japan).

### **Determinación del contenido de componentes de pared celular**

Hojas en Expansión, hojas completamente Extendidas, hipocótilo y segmentos de la base de la inflorescencia primaria (500 mg de muestra) se homogeneizaron en cuatro volúmenes de etanol absoluto y se hirvieron a baño maría durante 30 minutos. Posteriormente, se filtró el homogéneo en filtros de nitrocelulosa Watman de  $0,2 \mu\text{m}$  de tamaño de poro y el residuo insoluble en alcohol (RIA) se lavó con etanol y se secó a 37°C durante 14 h. Se determinó el peso de los

filtros (previamente tarados) y por diferencia se calculó el contenido total de componentes de pared celular, permitiendo estimar el contenido de pared por gramo de tejido (Zablakis *et al.*, 1995).

### **Determinación de pectinas, hemicelulosas y ligninas**

100 mg de fracción insoluble en alcohol (AIR), fueron homogenizados en 100 ml de agua (toda la noche, 20°C, agitación), filtrados y lavados 3 veces con agua de ionizada (10 ml) (pectinas solubles en agua). El residuo fue resuspendido en 100 ml de buffer EDTA-acetato (0.05M acetato de sodio; 0.04M EDTA) (4 h; 20 °C), filtrado y lavado 3 veces con 10 ml de buffer (pectinas solubles en EDTA). Este residuo fue resuspendido en 100 ml de 0.05M HCl (1h; 100 °C) frío, y posteriormente filtrado y lavado 3 veces con 10 ml of 0.05M HCl (pectinas solubles en HCl). Los lavados fueron guardados a -20°C. La concentración de ácido urónico fue determinada por el método *m*-hidroxidifenilo (Blumenkrantz y Asboe-Hansen, 1973) usando ácido galacturónico como standard (GA). Finalmente, el residuo remanente fue utilizado para la cuantificación de hemicelulosas. El mismo fue agitado con 100 ml de 4M NaOH (8 h; 20 °C), filtrado y lavado 3 veces con 5 ml of 4M NaOH (fracción hemicelulosa). La hidrólisis fue completada con una incubación final con 66% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (60 min; 100 °C) y el contenido de glucosa fue determinado utilizando el método de antrona (d'Amour, y col., 1993; Vicente, y col., 2005).

La determinación de ligninas fue realizada según lo reportado previamente (Iiyama y Wallis, 1988; Hatfield, y col., 1999) con algunas modificaciones. 5 mg del AIR fue tratado con bromuro de acetilo 25% (p/p) en ácido acético glacial, por 30 min a 70°C. Las muestras fueron neutralizadas con NaOH 2N y HAc glacial c.s.p. 100 ml de volumen final. La cuantificación de ligninas fue llevada a cabo determinando absorbancia a 290 nm. Todos los experimentos fueron llevados a cabo con 3 réplicas biológicas y dos réplicas experimentales.

### **Hidrólisis de pared celular y obtención de perfiles metabólicos**

Se ha llevado a cabo la hidrólisis de la pared celular de tallos de plantas de 28 días, de acuerdo con Minic y colaboradores (Minic, y col., 2009). Para el análisis del perfil metabólico total de hojas de *A. thaliana*, las plantas fueron crecidas por 28 días y cosechadas a mitad del día. Para el análisis por GC/MS, 60 µl de ribitol (0.3 mg/ml) fue agregado a cada muestra como standard interno. Luego, 750 µl de cloroformo fue agregado antes de centrifugar a 2200 g por 15 min. La derivatización de la muestra fue llevada a cabo, según se describe en Lisec y col. (Lisec, y col., 2006).



Para el análisis, cuatro réplicas biológicas y dos réplicas técnicas por tratamiento (8 réplicas en total). El análisis por GC–MS fue llevado a cabo utilizando un auto sistema XL de cromatografía gaseosa y un espectrómetro de masa Turbo (Perkin Elmer) en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas – UNR. 1 µl de muestra fue inyectado (relación de Split 1:40) a 280°C. La columna utilizada fue una VF-5 ms (Varian, Darmstadt, Germany) con las siguientes dimensiones: 30 m × 0.25 mm de diámetro interno, y un film de 0.25-µm film con gas helio como gas portador (“carrier”), a un flujo constante de 1 mL/min. El programa de temperatura fue 5 min a 70°C, rampa de 5 min a 310°C, y un calentamiento final por 2 min a 310°C. La línea de transferencia del MS fue configurada a 280°C. El espectro fue monitoreado en un rango de masa (m/z) de 70–600. La configuración del resto de los parámetros fue realizada de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los cromatogramas fueron adquiridos con el software TurboMass 4.1 (Perkin Elmer). El programa de búsqueda espectral NIST98 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) fue utilizado como plataforma. La MS y el tiempo de retención fueron comparados con la colección de la base de datos Golm Metabolome Database (Kopka, y col., 2005). Los apareamientos fueron manualmente supervisados y aceptados con un umbral >650 (con un emparejamiento máximo igual a 1000) y una desviación en el tiempo de retención <1.0%. La altura de los picos fue normalizada usando la cantidad de muestra fresca y el ribitol como estándar interno. El contenido relativo de los metabolitos fue determinado y el análisis estadístico de los mismos fue llevado a cabo mediante un ANOVA a una vía (ver Análisis estadístico).

### **Obtención de protoplastos**

Esta técnica fue llevada a cabo según se describe en Yoo y colaboradores (Yoo, y col., 2007). La digestión de la pared celular fue llevada a cabo a tiempos fijos (3h), pero con diferentes proporciones de enzimas (celulasa/macerozima), generando distintas condiciones: 0.5 [0.5% (p/v)/ 0.15% (p/v)]; 1 [1% (p/v)/ 0.3% (p/v)]; 1.5 [1.5% (p/v)/ 0.45% (p/v)]; 2 [2% (p/v)/ 0.6% (p/v)].

### **Digestibilidad de materia seca *in vitro***

Este método fue descrito en Tilley and Terry, 1963 (Tilley y Terry, 1963) y ha sido ligeramente adaptado. 0.2 g de tallos secos de Col-0, E8-SBD123.1 y E8-SBD123.2 fueron incubados con líquido ruminal a 40°C en oscuridad, por 48h, con cuatro agitaciones diarias. Las muestras fueron centrifugadas por 15 min a 1800 g y el precipitado fue tratado con 50 ml de una solución de quimosina (1g ml<sup>-1</sup> en 0.075N HCl) a 40°C por 48 h con agitaciones ocasionales. El

residuo insoluble fue lavado con agua y secado a 100°C hasta pesada constante. El peso seco de tubos “blanco” (representando partículas no digeridas y microorganismos derivados del líquido ruminal) fue restado, y la digestibilidad de la material seca (DMD) fue calculada como el peso del material digerible en 100g de tallos secos.

### **Determinación enzimática del contenido de almidón**

La determinación del contenido de almidón se realizó a partir de tejido fresco de hojas de plantas de *A. thaliana*. Se homogeneizó con N<sub>2</sub> (l) 0,5-0,6 g de tejido, se colocaron en tubos de 15 ml, e incubaron a 100°C por una 1 hora. Luego se agregó 5 ml de metanol:cloroformo:agua (12:5:3) y se agitó en vórtex, e incubó a 25°C por 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 2200 rpm por 10 minutos. Se retiró cuidadosamente el sobrenadante y esta extracción se repitió dos o tres veces más (hasta que el sobrenadante estuviera claro). Los restos de m:c:a se evaporaron colocando los tubos abiertos a 50°C por aproximadamente 2 horas. Luego se agregó 2,5 ml de NaOH 0,1 N. Los tubos se taparon y agitaron en vórtex hasta resuspender el pellet. Posteriormente se incubaron los tubos a 50°C por 30 minutos, agitando ocasionalmente para solubilizar el almidón. Se agregó 2,5 ml de ácido acético 0,1 N, para llevar el pH a 5.1. De los 5 ml finales, se separaron 300 µl en un tubo de 1,5 ml, y agregó 100 µl de la solución enzimática (\*) 10X y se mezcló utilizando vórtex. Los tubos se colocaron inmediatamente a 50°C por aproximadamente 20-24 horas. Luego de la incubación, se agitó en vórtex y se centrifugó un pulso corto para remover los restos de tejido. El sobrenadante se analizó espectrofotométricamente para determinar el contenido de glucosa mediante un kit comercial para la determinación de la glucemia (Wiener Lab.).

\* Solución enzimática ( $\alpha$ -amilasa/amiloglucosidasa), preparación stock 10X: Se disolvió 0,01 g de amiloglucosidasa y 1,3 g de  $\alpha$ -amilasa en 15 ml de buffer NaOAc 0,05 M, pH5.1.

### **Determinación de la relación amilosa-amilopectina**

La proporción de amilosa en almidón total, fue determinada utilizando Concanavalamina A para precipitar la fracción lineal del almidón. La posterior hidrólisis enzimática ( $\alpha$ -amilasa + amiloglucosidasa) de las fracciones solubles y precipitadas, y posterior cuantificación de glucosa (método de glucosa oxidasa), permite determinar la relación deseada. La determinación del contenido de almidón resistente fue llevada a cabo con un paso inicial de hidrólisis enzimática del almidón no-resistente, centrifugación seguida de lavados del pellet con una solución EtOH/H<sub>2</sub>O. La posterior disolución del pellet en una solución de KOH (y

neutralización), permiten hidrolizar completamente el almidón remanente. La glucosa liberada es determinada por el método de la glucosa oxidasa.

### **Ensayos de actividad enzimática**

Todas las actividades enzimáticas fueron ensayadas a 30 °C en un espectrofotómetro Hitachi 150-20 siguiendo espectrofotométricamente la oxidación de NAD(P)H a 340 nm en un volumen final de 1 ml, excepto para las medidas de la actividad catalasa, en cuyo caso el volumen final fue de 0,5 ml. Todos los ensayos fueron optimizados en términos de pH y la concentración de los cofactores/sustratos, corregidos para la actividad NADH oxidasa y lineales respecto del tiempo y la concentración del extracto crudo utilizado.

Las actividades enzimáticas informadas representan el promedio de al menos 4 determinaciones independientes. Se define una unidad internacional (U) como la cantidad de enzima que cataliza la formación o consumo de 1  $\mu$ mol de NAD(P)H por minuto en las condiciones especificadas.

### **Actividad almidón sintasa**

La actividad glucosiltransferasa de las distintas proteínas recombinantes fue determinada usando un método radiactivo previamente descrito por Ugalde y col. con modificaciones (Ugalde y col., 2003). El medio de reacción contenía MOPS 100 mM, pH 7,5; KCl 0,25 mM; glucógeno de músculo de conejo 10 mg (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), amilosa 10 mg (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) o amilopectina 10 mg (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), y ADP-[<sup>14</sup>C]Glc 1,25mM (1.3  $\mu$ Ci/nmol) o UDP-[<sup>14</sup>C]Glc 1,25 mM (1.1  $\mu$ Ci/nmol) como dador de glucosa, en un volumen final de 100  $\mu$ l. Luego de incubar 20 min. a 30°C la reacción se detuvo por la adición de 500  $\mu$ l de 75% (V/V) metanol y 1% (P/V) KCl, y se lavó dos veces con la misma solución. Para determinar la cantidad de radiactividad incorporada al polisacárido, el precipitado se resuspendió en 200  $\mu$ l de agua destilada y se midió con líquido de contador de centelleo. Una unidad de actividad se define como la incorporación al polisacárido de 1  $\mu$ mol de [<sup>14</sup>C]Glc (a partir de ADP-Glc o UDP-Glc) por minuto a 30°C.

### **Extracción de proteínas para electroforesis en dos dimensiones**

Se homogeneizaron 2 g de hojas de *A. thaliana* en mortero en presencia de N<sub>2</sub> líquido. Se utilizó polivinil poli pirrolidona insoluble (PVPP, Sigma) y arena para mejorar la pulverización del tejido. Luego, se adicionaron 5 volúmenes de Fenol-Tris-HCl pH 8,8 y 2.5 volúmenes de buffer de extracción (0,1 M Tris-HCl; 10 mM EDTA, 0,4 % (v/v) 2-ME; 0,9 M sacarosa, pH 8,8).

El extracto crudo resultante fue transferido a un tubo de centrifuga, agitado a 4 °C por 30 min y centrifugado a 5000 x g por 10 min a 4 °C en una centrifuga refrigerada Sorvall RC-5B en un rotor SS34. La fase fenólica fue recuperada y la fase acuosa fue re-extraída con un volumen de buffer de extracción y dos volúmenes de fenol. Se procedió de igual manera que para la primera extracción, es decir, se realizó una agitación vigorosa (con vórtex) y luego se centrifugó. La fase fenólica resultante se adicionó a la obtenida de la primera extracción, a esta fase se le realizó un lavado con 1 volumen de buffer de extracción, se centrifugó, se recuperó la fase fenólica y las proteínas fueron precipitadas durante toda la noche a -20 °C mediante el agregado de 5 volúmenes de 0,1 M acetato de amonio en 100 % (v/v) de metanol (a -20 °C). El precipitado fue recuperado mediante centrifugación a 20000 x g por 20 min a 4 °C. El pellet obtenido fue lavado dos veces con 0,1 M acetato de amonio en 100 % (v/v) de metanol frío, luego dos veces con acetona fría al 80 % (v/v) y finalmente una vez con etanol al 70 % (v/v). En cada uno de los casos se resuspendió el pellet completamente.

Finalmente, las proteínas precipitadas fueron resuspendidas en buffer DIGE (30 mM Tris-HCl; 7 M urea; 2 M tiourea; 4% 3-[(3cloroamildopropil)dimetilamonio)]-1-propanosulfonato, pH 8,5) y sonicadas, en pulsos de 2 segundos al 20% de potencia con períodos de descanso de 1 minuto en hielo entre cada pulso.

Estos extractos proteicos fueron posteriormente utilizados para realizar electroforesis en dos dimensiones y en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

### **Electroforesis diferencial en dos dimensiones (2D-DIGE)**

En cada uno de los geles bidimensionales se corrieron dos muestras, cada una marcada previamente con diferentes fluoróforos. Este sistema permite la identificación y cuantificación precisa de los diferentes puntos proteicos presentes en cada una de las muestras, las cuales son procesadas en forma simultánea en un mismo gel en dos dimensiones (2D).

Cada uno de los geles se realizó por triplicado utilizando en cada caso extractos proteicos independientes de cada muestra (réplicas biológicas). Luego de la corrida, las proteínas fueron visualizadas utilizando filtros específicos para cada fluoróforo, en un transiluminador UV (BioChemi System, UVP Bioluminescence Systems). Los filtros utilizados permiten la observación de la fluorescencia emitida por un fluoróforo, sin observarse interferencia de la emitida por el otro.

### **Marcado de las proteínas mediante fluoróforos**

El marcado de las proteínas se realizó con los compuestos fluorescentes Alexa 610 (máximo de absorción: 612 nm; máximo de emisión de fluorescencia: 628 nm) o Alexa 532 (máximo de absorción: 532 nm; máximo de emisión de fluorescencia: 554 nm) (Molecular Probes Inc., Invitrogen Ltd.). Previamente, cuando fue necesario, se ajustó el pH de las muestras entre 8,0 y 8,5 con buffer 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), según lo indicado por el proveedor. Las proteínas se marcaron a razón de 100 µg de proteínas: 20 nmol de marcador fluorescente en dimetilformamida. Después de mezclar con vórtex, las muestras se incubaron durante al menos 2 horas en hielo. La reacción de marcado fue finalizada mediante el agregado de 1 µL de lisina 1 mM.

A partir de este momento, las proteínas marcadas se mantuvieron resguardadas de la luz, para preservar la marca de los fluoróforos.

### **Primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF)**

Como se mencionó anteriormente, previo a la separación electroforética, se marcaron las muestras a comparar, cada una con un fluoróforo diferente. Cien µg de la muestra proteica marcada con Alexa 610 se mezclaron con 100 µg de muestra marcada con Alexa 532. A esta mezcla se le agregaron 9 µL de DTT 1 M, 1,5 µL de anfolitos pH 3-10 (Sigma) y 1,5 µL anfolitos pH 5-8 (Sigma), completando hasta un volumen final de corrida de 450 µL con buffer DIGE. Para la separación de las proteínas por punto isoeléctrico se utilizaron tiras de IEF con un gradiente lineal de pH entre 4 y 7 de 21 cm (Bio-Rad). Las muestras se separaron en la primera dimensión en un equipo Protean IEF Cell (Bio-Rad). La corrida consistió de 10 horas de rehidratación a 50 V; 1 hora a 500 V; 1 hora a 1.000 V; y el tiempo restante a 8.000 V, hasta alcanzar un voltaje final de corrida aproximado de 65.000 V. Las tiras se almacenaron a -80 °C hasta el momento de correr la segunda dimensión.

### **Segunda dimensión: SDS-PAGE**

Las tiras enfocadas fueron descongeladas y equilibradas, primero durante 10 minutos en buffer de equilibrio (6 M urea; 0,375 M Tris-HCl; 2% (v/v) SDS; 20% (v/v) glicerol; pH 8,0) conteniendo 130 mM DTT, y luego durante 10 minutos en buffer de equilibrio conteniendo 135 mM iodoacetamida, con agitación constante. A continuación, las tiras fueron colocadas sobre geles de acrilamida al 12,5% (p/v) y selladas con agarosa al 1,5% (p/v). En el extremo donde se ubicó el polo positivo de la tira, se sembraron marcadores de peso molecular marcados con alguno de los fluoróforos, mientras que en el otro extremo se agregó un papel de filtro con

buffer de siembra (60 mM Tris-HCl; 25% (v/v) glicerol; 2% (p/v) SDS; 14,4 mM  $\beta$ -mercaptoetanol; 0,1% (p/v) bromofenol; pH 6,8), el cual marca el frente de corrida electroforética. Las proteínas se separaron de acuerdo a su peso molecular a 1 W por gel, con agitación a 15 °C, durante 15-18 horas o hasta visualizar la caída del frente de corrida, utilizando un equipo Ettan Dalt six Electrophoresis System (GE Healthcare). Cabe recordar que para cada par, se realizaron tres separaciones bidimensionales utilizando muestras biológicas diferentes.

Una vez finalizada la corrida, se procedió a adquirir las imágenes obtenidas por la emisión de fluorescencia a 628 nm o 554 nm, correspondiente a la fluorescencia de las proteínas marcadas con cada uno de los fluoróforos. Se utilizó el digitalizador de imágenes BioChem i System UVP BioImaging System, empleando filtros diferenciales para cada fluoróforo. Los datos se guardaron en formato TIFF para su posterior análisis.

### **Análisis de los geles bidimensionales**

Las imágenes obtenidas fueron analizadas utilizando el programa informático Image Master 2D-Platinum (GE Healthcare) aplicando el siguiente protocolo. La detección de los puntos y la eliminación del ruido de fondo se realizaron para las imágenes de los geles importadas como archivos de imagen en formato gel. Los artefactos, tales como partículas de polvo o rayas detectadas como puntos proteicos, fueron removidos mediante edición manual. En los casos apropiados, algunas cadenas de puntos se separaron manualmente en entidades individuales.

Para comparar perfiles de proteínas entre dos muestras que se corrieron en un mismo gel o entre muestras corridas en distintos geles, se usó un procedimiento de normalización para tener en cuenta la variación en la carga total de proteínas en los geles. El volumen total de los puntos fue calculado, y a cada punto se le asignó un volumen de punto normalizado como una proporción de este valor total.

Para cada triplicado de imágenes, se seleccionó un gel de referencia global basándose en aquel que contenía el mayor número de puntos. El análisis llevado a cabo por el software realiza una comparación entre los geles del mismo grupo y genera valores medios de puntos y términos de errores asociados, de manera de considerar la variación de los puntos dentro de un conjunto dado. Seguidamente, se contrastan los patrones proteicos promediados provenientes de cada tipo de muestra en busca de diferencias significativas.

### Escisión de los polipéptidos de expresión diferencial de geles 2D. Espectrometría de masa (MALDI-TOF-TOF)

Para el análisis por espectrometría de masa de las proteínas seleccionadas, se corrió un gel preparativo sembrando 1,5 mg de proteínas, el cual se tiñó con Azul de Coomassie (0,1% (p/v) Azul de Coomassie R-250; 45% (v/v) metanol; 10% (v/v) ácido acético glacial) y se destiñó con solución de desteñido (10% (v/v) metanol; 10% (v/v) ácido acético glacial) (Bollag y col., 1996). Los puntos proteicos seleccionados en el análisis descrito en el punto anterior fueron cortados utilizando un tip estéril y almacenados individualmente en tubos de 1,5 ml a 4 °C.

Los puntos proteicos escindidos fueron enviados para el análisis por espectrometría de masa (MALDI-TOF-TOF) al CEBIQUIEM, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Se analizaron los péptidos tripticos de cada proteína y péptidos elegidos de cada muestra. Los datos de las masas obtenidas en cada caso se analizaron utilizando el programa BIOTOOLS como interface entre los software FLEXANALYSIS (especializado en el procesamiento de los espectros obtenidos) y MASCOT (Perkins y col., 1999), el cuál proveyó las bases de datos utilizadas para la interpretación final de los datos obtenidos de la espectrometría de masa (EM) realizada.

En primer lugar, se analizaron los espectros de EM introduciendo parámetros adecuados para la búsqueda en las bases de datos de Secuencias de proteínas no redundantes (nr) de *A. thaliana*. Los datos recogidos permitieron observar cuáles de los picos obtenidos por EM coincidían con el patrón de masas de la digestión teórica de una proteína contenida en las bases de datos mencionadas. Este procedimiento permitió identificar sólo algunos de los puntos proteicos obtenidos por electroforesis en 2D. Por este motivo, se recurrió al análisis mediante EM/EM, en el cuál algunos péptidos del espectro de EM (seleccionados por su buena relación señal/ruido) son fragmentados en péptidos más pequeños, lo que permite predecir la secuencia de aminoácidos que los compone para luego realizar la búsqueda por homología de secuencias en las bases de datos mencionadas, utilizando los parámetros adecuados para tal fin.

Finalmente, con el propósito de obtener la máxima confiabilidad en las asignaciones realizadas, se llevó a cabo el análisis combinado de EM-EM/EM. En este caso, se pretende lograr un enriquecimiento de la búsqueda por EM con al menos alguno de los péptidos fragmentados por EM/EM. También es factible que ocurra un re-direccionamiento de la búsqueda respecto de los resultados de EM hacia los candidatos sugeridos por el análisis de EM/EM, dado que la base de datos utilizada no está completa para la especie en estudio. De todos modos, la evidencia más fuerte recayó sobre aquellas asignaciones que mostraron coincidencia con las mismas

secuencias de las bases de datos a través de ambos análisis, es decir, cuando tanto el EM como el EM/EM condujeron al mismo candidato, permitiendo así la asignación inequívoca de una identidad a los puntos proteicos de expresión diferencial.

### **Alineamiento de secuencias aminoacídicas**

Los alineamientos de secuencias fueron realizadas utilizando las opciones brindadas por la herramienta BLASTP del NCBI (Altschul, y col., 1990). En los casos que se requieren alineamiento de proteínas con homología restringida a dominios, se utiliza la herramienta DELTA-BLAST (Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST) (Boratyn, y col., 2012). Las bases de datos utilizadas dependieron de la comparación en cada caso (UniProtKB/Swiss-Prot; nr; pdb). Los parámetros del algoritmo fueron configurado de la siguiente manera: longitud de palabra de 3; matriz BLOSUM62; y un costo de GAP predeterminado.

### **Construcción de base de datos de secuencias de CBM de la familia 22**

La secuencia de los dominios de las proteínas curadas de la familia 22 CAZy, fue obtenido mediante el análisis de la salida de la herramienta de consulta en bloque, de la herramienta CDsearch del NCBI (Marchler-Bauer y Bryant, 2004; Marchler-Bauer, y col., 2009; Marchler-Bauer, y col., 2011; Marchler-Bauer, y col., 2012), utilizando scripts en Perl (ver Anexo II). La salida de este código, fue utilizada para generar una base de datos en MySQL, en la cual se pueden generar consultas a conveniencia.

### **Alineamiento múltiple**

Los alineamientos fueron llevado mediante la herramienta MUSCLE (Edgar, 2004) utilizando los parámetros predeterminados. Posteriormente, se procedió a eliminar los gaps iniciales y a iterar 8 veces el alineamiento.

### **Construcción de árboles filogenéticos**

A partir del alineamiento múltiple, se procedió a evaluar inferencias filogenéticas con el método de Máxima Parsimonia de MEGA 7 (Kumar, y col., 2016), generando un árbol consenso inferido a partir de 1000 remuestreos. Los posibles eventos de duplicación fue determinado mediante el método descrito en Zmasek y Eddy (Zmasek y Eddy, 2001), utilizando un árbol no enraizado.



### Modelado de estructura 3D

En primer lugar, el modelado por homología fue llevado a cabo mediante el modo alineamiento de Swiss-model (Arnold, y col., 2006), a partir del alineamiento múltiple generado previamente, utilizando los parámetros por defecto. En segundo lugar, se llevó a cabo un modelado por homología basado en un alineamiento estructural utilizando el servidor de Phyre2 (Kelley, y col., 2015). Por último, la estructura 3D fue determinada mediante el método de enhebrado proteico, utilizando el servicio RaptorX (Peng y Xu, 2011). Todos los modelos obtenidos fueron evaluados utilizando la evaluación de estructuras de Swiss-model (<http://swissmodel.expasy.org/>) (Arnold, y col., 2006).

Finalmente, los modelos seleccionados fueron refinados mediante el programa ModRefiner (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/ModRefiner/>) (Xu y Zhang, 2011). Las estructuras de las regiones interdominio fueron predichas con el programa PEPFOLD 3.1 (Thevenet, y col., 2012; Shen, y col., 2014). Las imágenes de cada dominio, fueron generadas usando el programa UCSF Chimera (Pettersen, y col., 2004).

### Estudios de acoplamientos

Los estudios de acoplamientos fueron llevados a cabo para predecir los sitios de unión putativos de los diferentes polisacáridos a los CBM. Para esto, fueron utilizados los sustratos xilotetraosa (asemeja xilano), celohexaosa (asemeja celulosa) y la estructura de un hexagalacturonato metilado (asemeja pectina). Mediante el programa Autodock Vina (Trott y Olson, 2010) obtuvimos una variedad de estructuras, las cuales fueron seleccionadas por su energía de unión. Los archivos PDBQT (formato de archivo de estructura molecular utilizado por Autodock Vina) fueron generados utilizando MGLTools. La celda de malla (“grid box”) fue configurado con los siguientes valores para XYL1: center\_x = 0.00; center\_y = 2.00; center\_z = 12.00; size\_x = 26.00; size\_y = 21.00; size\_z = 19.00; energy\_range = 3; exhaustiveness = 8; num\_modes = 9. Para XYL2: center\_x = 15.00; center\_y = 9.00; center\_z = -4.00; size\_x = 30.00; size\_y = 20.00; size\_z = 22.00. Para XYL3: center\_x = 5.00; center\_y = -12.00; center\_z = 12.00; size\_x = 25.00; size\_y = 20.00; size\_z = 22.00.

### Curvas de desnaturalización

Para esto utilizamos un espectrofotómetro, utilizando una concentración de proteína de 10  $\mu$ M en 25 mM Tris/HCl, pH 7,4. La temperatura del bloque térmico fue configurada para un rango de 25°C a 90°C con una tasa de incremento de 1°C/min. La absorbancia de los aminoácidos aromáticos fue determinada a una  $\lambda$  293 nm a intervalos de 5 s. Fue utilizada una regresión

Sigmoidea para ajustar la curva con la ecuación indicada en la Figura 21. La Temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) fue determinada mediante la ecuación de regresión y corresponde a la temperatura a la cual el 50% del polipéptido se encuentra desplegado

### **Preparación de soluciones de polisacáridos stock**

Utilizamos xilano de madera de abedul (“Xylan from birch wood”) de Sigma<sup>®</sup> (X0502);, carboximetil celulosa Sigma<sup>®</sup> (C5678 ); y pectina de manzana Sigma<sup>®</sup> (76282) como sustrato (1%) para los ensayos de unión. Para un volumen final de 20 ml de solución de polisacárido 1%, tomamos 5 ml de etanol absoluto (95%) y 2 ml de agua, junto con 0.2 g de polisacárido. Esta solución fue calentada a 100°C con agitación continua. Una vez que el polisacárido se disolvió completamente, la solución fue enfriada a temperatura ambiente, y el volumen final fue completado con agua.

### **Medidas espectrofluorométricas**

Todos los experimentos fueron llevados a cabo usando XYL2 10  $\mu$ M y sus respectivos en buffer 25 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5. La longitud de onda de excitación utilizada fue de 295 nm y las intensidades de emisión fueron recolectadas en un rango comprendido entre 300 y 450 nm ( $\lambda_{em}$ ), promediándose 5 barridos. Los experimentos de extinción de fluorescencia ("quenching") fueron llevados a cabo con el agregado de acrilamida 5M en buffer Tris-HCl pH 7,5. Los datos fueron graficados como intensidad de fluorescencia relativa ( $F_0/F$ , donde  $F_0$  es la intensidad de fluorescencia en ausencia de acrilamida; y  $F$  es la intensidad de fluorescencia en presencia de acrilamida) en función de la [acrilamida]. Los experimentos de unión cuantitativa fueron llevados a cabo por el agregado de cantidades correspondientes de carbohidratos 1% en mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 con agitación continua. La intensidad de fluorescencia fue determinada 2 min después de cada agregado usando longitud de onda de excitación de 295 nm y una longitud de onda de emisión de 350 nm. Las soluciones de carbohidratos utilizadas no emitían de fluorescencia en las condiciones evaluadas.

### **Medidas de dicroísmo circular**

Los espectros de dicroísmo circular fueron determinados en presencia de la proteína pura (5  $\mu$ M) y en presencia de cantidades fijas (0,2%) de distintos carbohidratos (xilano, pectina y carboximetilcelulosa) en buffer mM Tris-HCl, pH 7,4. Los espectros de CD en el UV lejano, fueron obtenidos usando un espectropolarímetro Jasco J-810 (Jasco International Co.) en un rango de longitud de onda entre 200 y 250 nm, a 25°C. Las medidas fueron llevadas a cabo en una cubeta de cuarzo con un paso óptico de 0,2 cm a 100 nm.min<sup>-1</sup>, un ancho de banda de 1nm,

un tiempo de respuesta de 2s, la recolección de datos fue realizada cada 1nm, y una integración de 10 espectros.

### **Análisis Estadístico**

En el caso que no se exprese lo contrario, los experimentos fueron llevados a cabo de acuerdo con un diseño factorial completamente aleatorizado, en el cual el factor principal es el tipo de planta (Col-0, E8-SBD123.1 o E8-SBD123.2). La asunción de normalidad fue corroborada con un test de Shapiro-Wilk, y la igualdad de varianza mediante un test de Levene. Cuando la asunción de normalidad no se ha cumplido, fueron utilizados ANOVA no paramétricos (Kruskal–Wallis). Finalmente, para aislar el grupo o los grupos que difieren de los otros, se llevó a cabo un test de comparaciones múltiples paramétrico (Tukey), o en el caso que no pueda utilizarse, se recurrió a un test no paramétrico (Dunn). En cada caso, la significancia de los test utilizada fue de 0.05.

# I. CAPÍTULO 1:

---

## Caracterización de plantas E8-SBD123

## Introducción:

La pared celular de la mayoría de las angiospermas, incluyendo *Arabidopsis thaliana*, comprende un marco rígido de microfibrillas de celulosa interaccionando con xiloglucanos solubles, los cuales se encuentran embebidos con los componentes matriciales de pectinas (Carpita, 1996). Esta estructura es capaz de brindar el soporte mecánico de la pared celular además de controlar muchos procesos fisiológicos tales como la porosidad de la pared, la alteración de la densidad de carga y el crecimiento. La pared celular de *Arabidopsis* contiene una amplia variedad de proteínas estructurales, las cuales pueden interaccionar entre ellas, o con los polisacáridos de la pared celular (Cassab, 1998).

Las hemicelulosas se ensamblan en una combinación variable de esqueletos de monosacáridos generando una gran diversidad de estructuras ramificadas definidas por la especie (Gilbert, y col., 2008; Pauly, 2013). En la mayoría de las plantas superiores (incluyendo *A. thaliana*), la matriz no celulósica se forma principalmente por xiloglucanos (XyG) y pectinas. En las plantas con flores, el XyG es el componente mayoritario de la hemicelulosa (más del 25%) aunque es el componente minoritario (apenas detectable) en las paredes celulares de gramíneas (poáceas) (Zabotina, 2012). En contraste, el xilano se ha detectado en pequeñas cantidades en las paredes celulares de las plantas con flores, mientras que en las poáceas, el glucuronoarabinoxilano es la hemicelulosa dominante. Esto sugiere que el reemplazo de las hemicelulosas ha ocurrido durante la evolución de las plantas (Carpita, 1996). El glucuronoarabinoxilano consiste en xilasas unidas por enlaces  $\beta$ -1,4, con acetilación parcial, y ramificaciones en O2 y O3 que consisten principalmente en arabinosa y glucuronato (Pauly, 2013; Walker, y col., 2015).

Los XyG consisten de un esqueleto de glucosa, unido por enlaces  $\beta$ -1,4, con acetilaciones parciales y ramificaciones a partir del O6. Estas ramificaciones siempre contienen xilosa, seguidas o no, por otros azúcares como galactosa y fucosa (Pauly, 2013). La nomenclatura de las mismas se basa en códigos de una letra, las cuales se usan para ejemplificar las ramificaciones de cada monómero de glucosa. Por ejemplo, la letra mayúscula “G” se utiliza para representar un residuo Glcp no ramificado; la letra “X” se utiliza para representar un residuo Glcp ramificado por una xilosa; la letra “L” representa un residuo Glcp ramificado por un disacárido Xilp- $\alpha$ (1-2)-Galp; la letra “F” se utiliza para representar un residuo Glcp sustituido por un trisacárido Xilp- $\alpha$ (1-2)-Galp- $\alpha$ (1-2)-Fucp, etc. (York, y col., 1986). De esta forma, el XyG de *A. thaliana*, se compone principalmente de subunidades repetidas de XXXG (York, y col., 1986).

En células en crecimiento esta estructura rígida debe ser capaz de extenderse al tamaño correcto. Para esto, las células no pueden simplemente depositar más material para extender la pared sino que este proceso debe compensar siempre la presión interna de turgor (Cosgrove, 1993). De esta forma, el proceso de debilitación de la pared (“loosening effect”) es requerido para promover la flexibilidad de la misma mientras se mantiene su integridad estructural; así, la expansión celular resulta de un balance entre la presión de turgor y el fortalecimiento mecánico de la pared. Asimismo, se requiere de la integración de la relajación local y la deposición controlada de componentes de la pared para la coordinación precisa del crecimiento celular. Muchas proteínas, tales como las expansinas, xiloglucano endo-transglucosilasas y endo-xiloglucano transferasas, como también radicales hidroxilos, se encuentran involucrados en el proceso de debilitación de la pared. Cualquier intento de modificar las propiedades de la pared celular (ya sea la relación lignina/hemicelulosa, área superficial y el grado de cristalinidad de la celulosa) (Arantes y Saddler, 2010) puede afectar directamente la habilidad de hidrolizar el sustrato asociado, evitando la necesidad de modificar la eficiencia catalítica de los procesos enzimáticos relacionados.

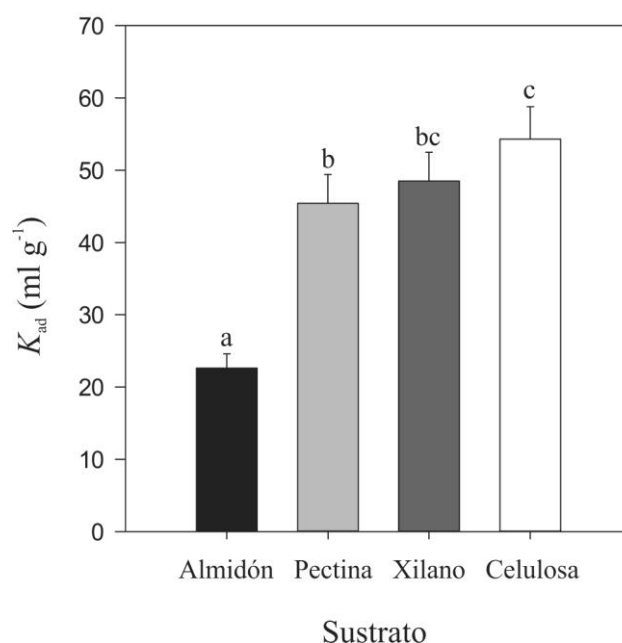
Los CBM pueden facilitar la hidrólisis de celulosa *in vitro* a través del mecanismo disruptivo. Específicamente, el añadido de CBM de bacterias y hongos facilita la hidrólisis de celulosa mediante la disrupción física de la red de fibras de celulosa (Teeri, y col., 1992; Sato, y col., 2010; Abbott y Boraston, 2012). Existen unos pocos reportes de la sobreexpresión de CBM en plantas, estos CBM se encuentran relacionados a enzimas relacionadas al metabolismo (y degradación) de la pared celular de plantas (Shoseyov, y col., 2001; Levy, y col., 2002; Shoseyov, y col., 2006; Obembe, y col., 2007; Nardi, y col., 2015).

En esta tesis demostramos que la región N-terminal de *A. thaliana* SSIII (SBD123) puede unirse a polisacáridos de pared celular. Además, estos dominios fueron direccionados satisfactoriamente hacia la pared celular de plantas de *A. thaliana*, lo cual provocó un marcado incremento en la degradabilidad de la biomasa como así también un incremento de las unidades de glucosa liberadas. Estos resultados sugieren que los SBD pueden ser usados como una potencial herramienta biotecnológica para la modificación de la pared celular de plantas y que podrían ser utilizados para resolver problemas específicos en la industria del biocombustible y la ganadería.

## Resultados:

**SBD123 se une preferencialmente a los polisacáridos de pared celular**

Previamente se ha demostrado que los SBD se unen cooperativamente a polisacáridos de almacenamiento, tales como el almidón, la amilopectina y más marcadamente a la amilosa, sugiriendo una preferencia por los polisacáridos lineales (Valdez, y col., 2008; Valdez, y col., 2011). Para evaluar la adsorción de los SBD a polisacáridos estructurales hemos investigado la capacidad de los SBD recombinantes para unirse a diversos polisacáridos componentes de la pared celular vegetal mediante ensayos de cosedimentación. Como se muestra en la Figura I-1, la proteína SBD123 es capaz de unirse a xilano y pectinas con el doble de afinidad que al almidón, mientras que la  $K_{ad}$  por celulosa fue 2.4 veces mayor que por el almidón. De esta manera, los dominios SBD123 pueden unirse a los tres polisacáridos de pared ensayados reflejando cierto grado de promiscuidad de los mismos debido a que no solo se unen a su sustrato natural, sino también a otros polisacáridos y con mayor afinidad. La proteína BSA (utilizada como control) no se ha unido significativamente a ninguno de los polisacáridos ensayados, sugiriendo que la habilidad de unión, es específica de los SBD123.



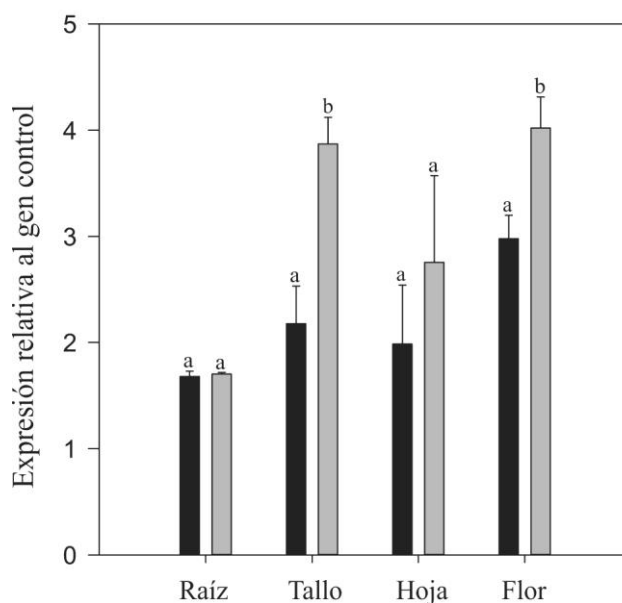
**Figura I-1 SBD123 se une in vitro al almidón y a polisacáridos de la pared celular.**

Los valores de las constantes de adsorción del SBD123 recombinante al almidón (negro), xilano (gris) y celulosa (blanco). Los datos mostrados son el promedio  $\pm$  SD (“standard deviation”) de tres réplicas biológicas. Las letras en minúscula (a, y c), indican el o los grupos que difieren de otros, determinados mediante un test de comparaciones múltiples (Tukey), después de un análisis estadístico con un  $\alpha = 0.05$ .

### SBD123 es dirigido a la pared celular de *Arabidopsis thaliana*

Una construcción quimérica conteniendo la secuencia de la región N-terminal de la SSIII de *A. thaliana* (AT1G11720), que codifica para los tres dominios de unión a almidón (SBD123) fusionados con el péptido señal de la expansina 8 de *A. thaliana* (AT2G40610), fue clonada en el vector pDONR221<sup>TM</sup> y posteriormente recombinada al vector de destino pCTAPi298 (Rohila, y col., 2004) bajo el control del promotor CaMV 35S como se describe en la sección 6-16 materiales y métodos.

Luego de la transformación y selección de plantas, dos líneas transgénicas, E8-SBD123.1 y E8-SBD123.2, fueron seleccionadas en la etapa de crecimiento 1.11(Boyes, y col., 2001) . El análisis de la expresión del transgen (qRT-PCR), fue llevado a cabo utilizando cebadores específicos (diseñados para abarcar el péptido tránsito y la secuencia SBD1): E8-SBD123Fw y E8-SBD123Rv (Tabla I-6), con un producto de amplificación de 155 pb. Diferentes órganos (raíz, tallo, hoja y flores) de estas líneas y plantas Col-0 fueron ensayados mostrando la



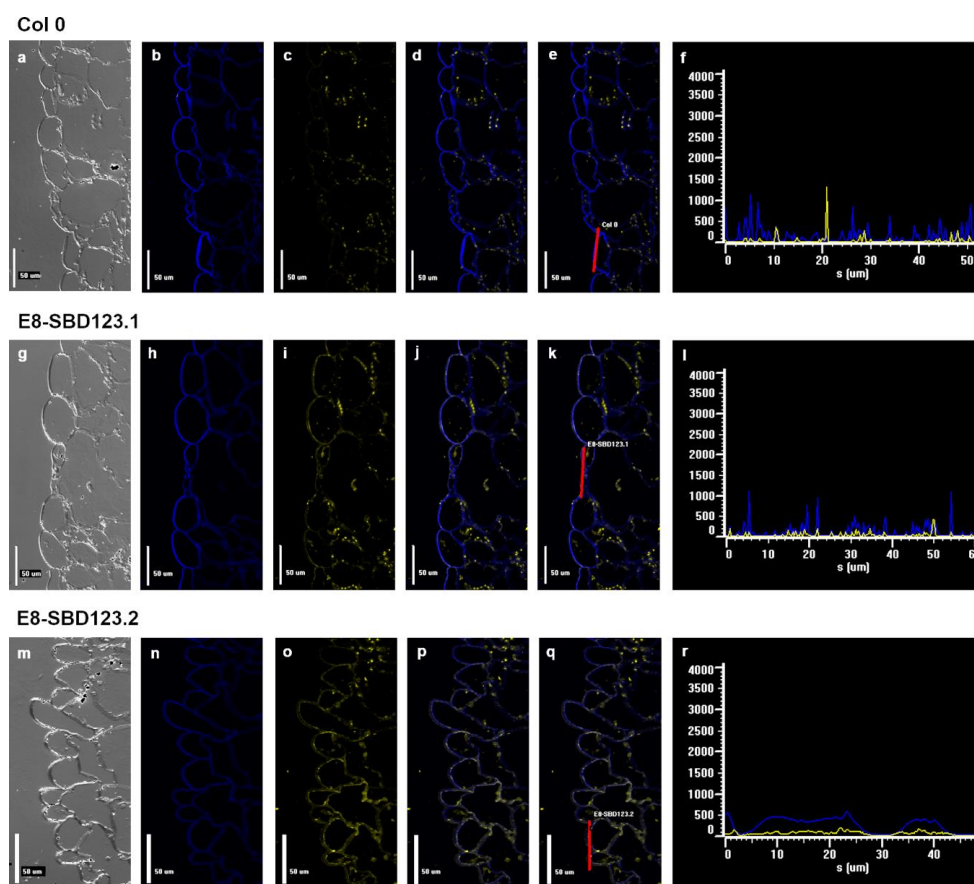
**Figura I-2 Expresión relativa del transgen E8-SBD123 transgen obtenida mediante qPCR en Tiempo Real.**

La expresión del transgen fue evaluada en dos líneas transgénicas independientes, E8-SBD123.1 (negro) y E8-SBD123.2 (gris). No se detectó señal específica del transgen en todos los órganos Col-0 ensayados. Los niveles de expresión fueron relativizados a  $\beta$ -ACT como control interno. Se muestran los promedios  $\pm$  SD de tres réplicas biológicas. Las letras en minúscula (a y b), indican el o los grupos que difieren de otros, determinados mediante un test de comparaciones múltiples (Tukey), después de un análisis estadístico con un  $\alpha = 0.05$ .



expresión del transgen en ambas líneas transgénicas, pero no en las plantas Col-0 (Figura I-2).

Para verificar la localización correcta de los SBD123 en las plantas transgénicas llevamos a cabo ensayos de inmunohistoquímica y microscopía confocal en plantas silvestres y transgénicas (Figura I-3). Un anticuerpo a-SBD2 generado anteriormente en el laboratorio fue utilizado como anticuerpo primario, mientras que un anticuerpo a-IgG de conejo conjugado con TRITC, fue utilizado como anticuerpo secundario (señal amarilla). Las paredes celulares fueron



**Figura I-3 Localización subcelular de SBD123 en líneas de *A. thaliana* Col-0 y E8-SBD123.**

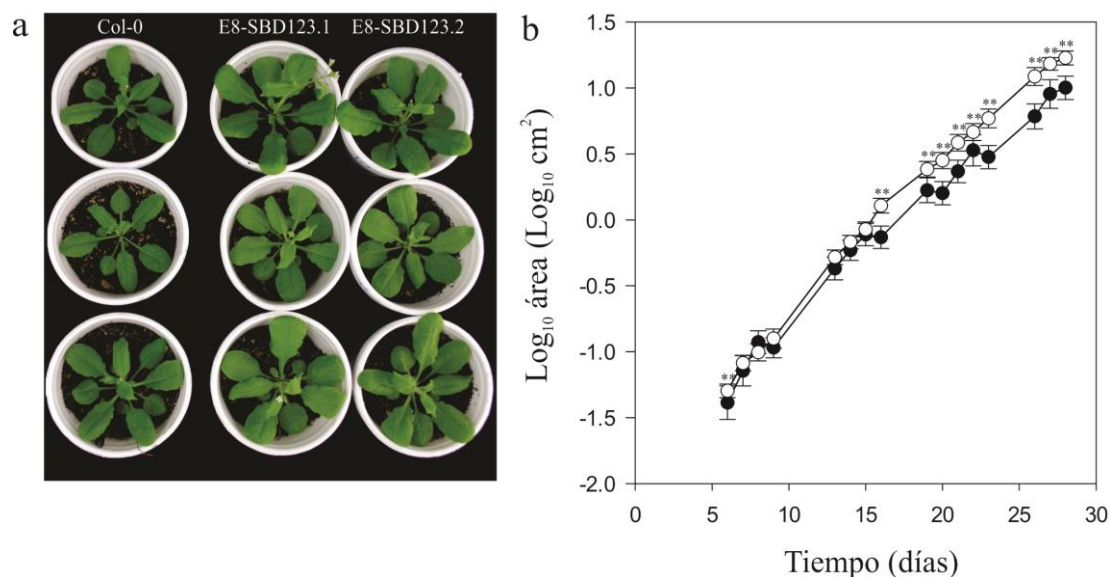
Las micrografías confocales laser de barrido muestran la localización de SBD123 en hojas de líneas *Arabidopsis* Col-0 (a-d), E8-SBD123.1 (f-i) y E8-SBD123.2 (k-n). Las paredes celulares fueron teñidas con calcoflúor (azul) y la proteína SBD123 fue detectada por el anticuerpo a-SBD2, seguido por un anticuerpo secundario IgG a-conejo conjugado a TRITC (amarillo). Los paneles d, j y p, muestran el solapamiento de señales, y los paneles f, j y o, muestran los gráficos de perfiles de intensidad para cada canal del espectro de emisión a través de las líneas indicadas en los paneles e, k y q. Los experimentos fueron repetidos tres veces, obteniendo resultados similares.

teñidas con calcoflúor (señal azul), y el color blanco en las imágenes fusionadas (azul + amarillo) sugiere la correcta expresión y localización de los SBD123 en la pared celular de las plantas transgénicas (Figura I-3). El anticuerpo a-SBD2 es capaz de unirse a la SSIII endógena localizada en los cloroplastos y, como se muestra en la Figura I-3, la fluorescencia de TRITC fue detectada en estas organelas tanto en plantas Col-0 como en plantas transgénicas.

### Caracterización fenotípica de las plantas transgénicas

#### Las plantas E8-SBD123 presentan mayor tamaño que las silvestres

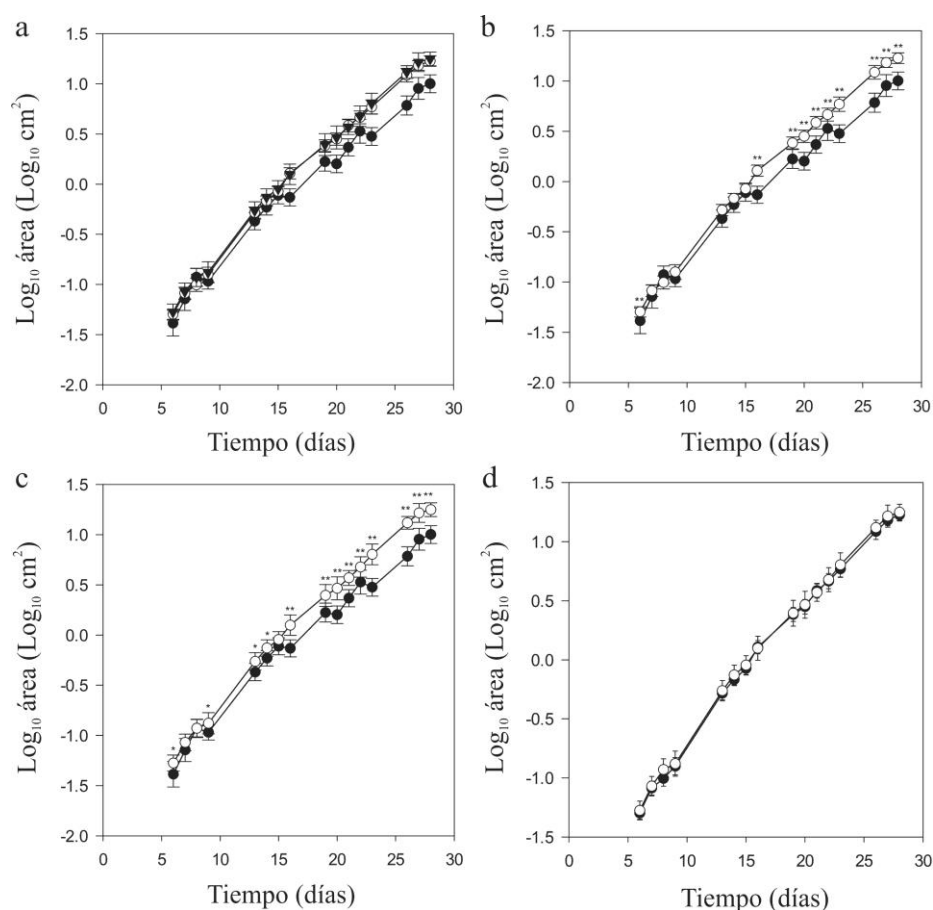
El crecimiento es un parámetro clave utilizado para evaluar la relevancia de un genotipo específico en ciencias aplicadas a cultivos (Beemster y Baskin, 1998). En este estudio, la inspección visual de las plantas transgénicas sugirieron que las mismas crecen normalmente aunque presentan un incremento de tamaño en comparación con plantas silvestres (Figura I-4). Además, ambas líneas transgénicas comparten el mismo comportamiento comparadas con plantas Col-0 (Figura I-5).



**Figura I-4 Fenotipo de crecimiento de plantas Col-0 y E8-SBD123.**

a) Las plantas transgénicas muestran un marcado incremento de tamaño a 28 días post-germinación- E8-SBD123.1 y E8-SBD123.2 son dos líneas independientes. b) Análisis de crecimiento muestra la transformación logarítmica del área de crecimiento de la roseta a través del tiempo de E8-SBD123.1 (blanco) y Col-0 (negro). (\*\*) Diferencia significativa  $p < 0.01$ .

Hemos detectado un incremento de 1.8 veces en el peso seco y fresco de las líneas E8-SBD123.1 y E8-SBD123.2 comparadas con Col-0 (Tabla I-1) y para determinar si existe un aumento significativo en la tasa de crecimiento de las plantas, hemos determinado diariamente al área de las rosetas (ver sección 6-23 de materiales y métodos). Como se muestra en la Figura I-4b, se ha observado un aumento en el área de la roseta a partir del día 16 post-germinación (etapa 1.04). La etapa 1 en el crecimiento de *A. thaliana*, comprende mayoritariamente en el desarrollo de la hoja, comprendido desde la imbibición de la semilla, hasta las fases vegetativas temprana (1.04, día 16) y tardía (1.14, día 25) (Boyes, y col., 2001). Se considera que la etapa 1 es impulsada principalmente por la proliferación celular, mientras que al comienzo de la etapa 3



**Figura I-5 Fenotipo de crecimiento de plantas Col-0 y E8-SBD123.**

a) Visualización combinada del logaritmo del área de la roseta de Col-0 y de las dos líneas de plantas transgénicas. b) Logaritmo del área de la roseta de Col-0 (círculo negro) comparado con E8-SBD123.1 (círculo blanco). c) Logaritmo del área de la roseta de Col-0 (círculo negro) comparado con E8-SBD123.2 (círculo blanco). d) Logaritmo del área de la roseta de E8-SBD123.1 (círculo negro) comparado con E8-SBD123.2 (círculo blanco). (\*\*) Diferencia significativa  $p < 0.01$ .

(día 18 a 29), el crecimiento es mediado esencialmente por la expansión celular (Donnelly, y col., 1999). Por esto, decidimos investigar la causa de estas diferencias.

A pesar de que la evaluación del crecimiento puede ser un proceso relativamente directo, la combinación de dos o más parámetros morfológicos (índices morfológicos) puede utilizarse para describir un estado abstracto de las plántulas, tales como la importancia relativa de un factor particular en el rendimiento a campo (Duryea, 1985). Por ejemplo, una versión modificada del índice de calidad de Dickson (QI) (Ritchie, 1984) resume el estado fenotípico de una planta, estableciendo una relación entre el peso seco y fresco del tallo y la raíz, el diámetro de la raíz y la longitud del tallo (ver sección 6-24 de materiales y métodos). Este parámetro fue significativamente mayor en las líneas E8-SBD123.1 (12.45) y E8-SBD123.2 (11.66), en comparación con Col-0 (6.52), lo cual traza un paralelo con las diferencias observadas en estas líneas (Tabla I-1).

Por otro lado, Villar y colaboradores (Villar, y col., 2004) han informado diversos parámetros para evaluar la tasa de crecimiento de especies leñosas procedentes de los bosques mediterráneos. Hemos adaptado la utilización de estos parámetros a *Arabidopsis thaliana* para intentar justificar un posible aumento en la tasa de crecimiento vegetativo. Generalmente se considera que los componentes morfológicos como la proporción de biomasa distribuida en los diferentes órganos, las tasas de fotosíntesis y respiración, y la composición química de la hoja, deben intervenir de forma decisiva en las tasas de crecimiento (Villar, y col., 2004). De esta manera, se evaluaron parámetros asociados al componente morfológico del crecimiento, como la razón de área foliar (LAR, siglas del inglés “leaf area ratio”) y el área específica foliar (SLA, siglas del inglés “specific leaf area”).

LAR es la relación de área foliar y peso total de la planta y se expresa en  $\text{m}^2$  (hoja)  $\text{kg}^{-1}$  (planta), mientras que SLA es la relación de área foliar y peso de hoja (Se expresa en  $\text{m}^2$  (hoja)  $\text{kg}^{-1}$  (hoja)). Además, LAR es igual al producto de SLA por LMF (“leaf mass fraction”) [ $\text{m}^2$  (hoja)  $\text{kg}^{-1}$  (planta)] = [ $\text{m}^2$  (hoja)  $\text{kg}^{-1}$  (hoja)]  $\times$  [ $\text{kg}$  (hoja)  $\text{kg}^{-1}$  (planta)] (Villar, y col., 2004). No se observaron cambios significativos en la razón del área foliar (LAR) en las plantas transgénicas que justifiquen un posible aumento en la tasa de crecimiento. Al contrario, hemos encontrado una disminución significativa en el SLA de las plantas E8-SBD123, sugiriendo que el aumento de la tasa de crecimiento no se debería a una alteración en estos componentes morfológicos.

Hemos determinado parámetros que evidencian la asignación de recursos a los órganos de la planta como por ejemplo la proporción de hoja (LMF) y la proporción de raíz (RMF, siglas del

Parámetro	Col-0	SD	E8-SBD123.1	SD	E8-SBD123.2	SD	p<0.05
Índice de calidad	6.524(a)	1.734	12.447(b)	3.444	11.662(b)	3.573	Sí*
Peso fresco (g)	1.000(a)	0.379	1.617(b)	0.383	1.786(b)	0.165	Sí**
Peso seco (g)	0.073(a)	0.018	0.125(b)	0.035	0.119(b)	0.025	Sí*
Tasa de elongación de la raíz (RER) (cm día <sup>-1</sup> )	0.473(a)	0.194	0.702(b)	0.164	0.739(b)	0.186	Sí*
LAR (m <sup>2</sup> kg <sup>-1</sup> FW)	0.163	0.009	0.149	0.034	0.141	0.019	No
SLA (m <sup>2</sup> kg <sup>-1</sup> FW)	3.242(a)	0.177	2.522(b)	0.072	2.578(b)	0.188	Sí**
LMF (kg kg <sup>-1</sup> FW)	0.049	0.002	0.062	0.013	0.054	0.011	No
RMF (kg kg <sup>-1</sup> FW)	8.0 10 <sup>-3</sup>	8.0 10 <sup>-4</sup>	8.3 10 <sup>-3</sup>	2.0 10 <sup>-4</sup>	7.7 10 <sup>-3</sup>	8.0 10 <sup>-4</sup>	No
DM (kg kg <sup>-1</sup> FW)	0.079	0.004	0.077	0.006	0.079	0.005	No
CRA (%)	77.042	8.696	77.944	7.240	77.362	7.607	No
Hipocótilo longitud (oscuridad) (mm)	0.955	0.200	0.919	0.188	0.963	0.295	No
Hipocótilo longitud (mm)	0.511(a)	0.077	0.561(b)	0.056	0.604(c)	0.052	Sí***

**Tabla I-1 Parámetros de crecimiento vegetativo de líneas Col-0 y E8-SBD123.**

Todas las comparaciones fueron realizadas utilizando un ANOVA paramétrico con un  $\alpha=0.05$ . (a), (b) o (c) fueron usados para aislar el grupo o los grupos que difieren de los otros, por medio de un test de comparaciones múltiples. Diferencia significativa (\*)  $p<0.05$ ; (\*\*)  $p<0.01$ ; (\*\*\*)  $p<0.001$ .

inglés “root mass fraction”). LMF es la relación de biomasa de hojas y la biomasa total de la planta [ $\text{kg (hoja) kg}^{-1}$  (planta)] y RMF es la relación de biomasa de raíz y biomasa total de la planta [ $\text{kg (raíz) kg}^{-1}$  (planta)]. En ninguno de los dos casos se evidencian diferencias significativas entre plantas E8-SBD123 y Col-0. De esta forma consideramos que si bien las plantas transgénicas presentan un aumento en los tamaños de órganos vegetativos como raíz y hojas, no poseen una alteración en la asignación de recursos a estos órganos.

Por último se calculó el contenido de materia seca (DM, siglas del inglés “dry matter”) que es la relación entre el peso seco y el peso fresco de la planta expresada en  $\text{kg (peso seco) kg}^{-1}$  (peso fresco) sin observarse diferencias significativas y sugiriendo la ausencia de una alteración en el contenido de agua en las plantas E8-SBD123. Para confirmar esto, hemos evaluado el contenido relativo de agua (CRA) tanto en plantas silvestres como en transgénicas. Este parámetro indica

Parámetro	Col-0	SD	E8-SBD123.1	SD	E8-SBD123.2	SD	p<0.05
Tasa elongación del tallo (SER) (mm/día)	12.599(a)	3.815	24.030(b)	8.169	24.112(b)	3.993	Sí*
SMF (kg/kg)	0.056(a)	0.005	0.087(b)	0.0186	0.082(b)	0.014	Sí*
Longitud silícula (cm)	1.4	-	1.5	-	1.5	-	No†
Longitud internodo (cm)	1.539	0.416	1.393	0.392	1.493	0.328	No
Nº semillas/silícula	48	-	54	-	47	-	No†

**Tabla I-2 Parámetros de crecimiento reproductivo en plantas Col-0 y E8-SBD123.**

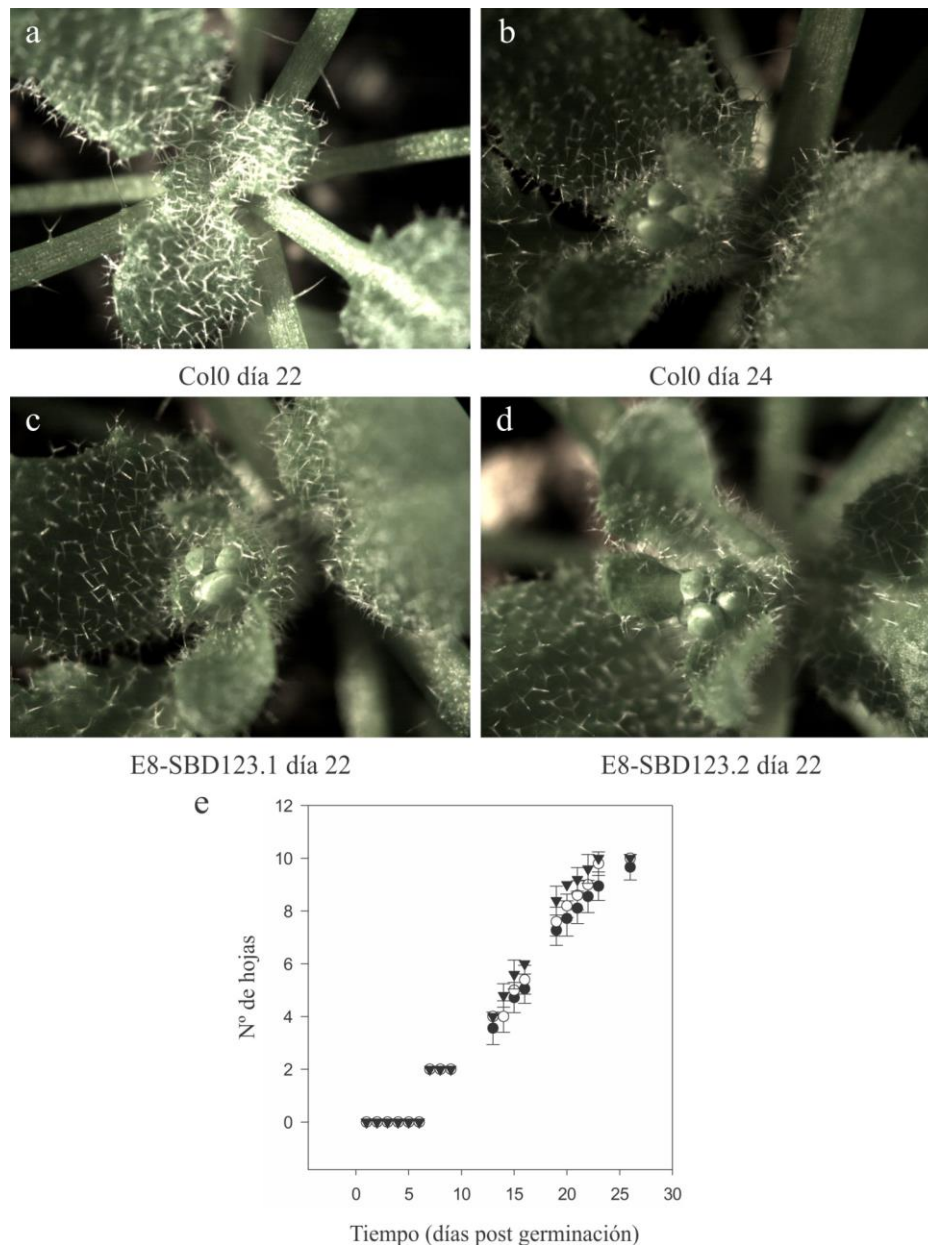
Los parámetros TIL, Longitud de hipocótilo, Distancia internodo y el Nº de semillas/silículas fueron determinados según Weigel (Weigel y Glazebrook, 2002). El parámetro SMF fue determinado según (Villar, y col., 2004) a 28 días post-germinación. Todas las comparaciones fueron llevada a cabo con un test ANOVA paramétrico con un  $\alpha=0.05$ . (†) Indica el uso de un ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wallis). (a) o (b) fueron usados para aislar el grupo o los grupos que difieren de los otros, por medio de un test de comparaciones múltiples. Diferencia significativa (\*)  $p<0.05$ ; (\*\*)  $p<0.01$ ; (\*\*\*)  $p<0.001$ .

el grado de hidratación de la planta, pero no el contenido total de la misma. No hemos encontrado diferencias significativas en el CRA indicando que el grado de hidratación de ambas líneas de plantas es el mismo en las condiciones controladas del laboratorio (humedad 80%, 23°C, ciclo luz-oscuridad 16/8).

A partir de las etapa de crecimiento 5, *A. thaliana* establece el crecimiento reproductivo (Boyes, y col., 2001; Weigel y Glazebrook, 2002). Analizando parámetros claves de esta etapa encontramos que las tasas de elongación del tallo (SER) (Tabla I-2) y de la raíz (RER) (Tabla I-1) se encuentran significativamente aumentadas en ambas líneas transgénicas si son comparadas con Col-0. De esta forma, el parámetro SER aumenta aproximadamente 1.9 veces y 1.5 veces en E8-SBD123.1 y E8-SBD123.2 respectivamente, mientras que RER aumenta 1.5 veces en E8-SBD123.1 y 1.6 veces en E8-SBD123.2 comparado con plantas silvestres.

También se adaptó el parámetro proporción de tallo (SMF; del inglés “stem mass fraction”) propuesto por Villar y colaboradores (Villar, y col., 2004), que muestra la relación de la biomasa del tallo y la biomasa total de la planta [ $\text{kg (tallos)} \text{ kg}^{-1} \text{ (planta)}$ ]. En la Tabla I-2 observamos que existe, aproximadamente un aumento de 1.5 veces en los valores de SMF en las plantas transgénicas, en comparación con las silvestres. Por otro lado, se observó un aumento significativo en la longitud del hipocótilo (mm) cuando las plántulas son sometidas a un ciclo luz-oscuridad (16h-8h) pero no se observa esta diferencia cuando las plántulas se someten a

oscuridad continua. Por último, fueron evaluadas las características macroscópicas de las silicuas, ya sea su tamaño, la distancia internudo, el número de semillas por silicuas y en ninguno de los tres parámetros se observó diferencia entre las plantas transgénicas y silvestres.



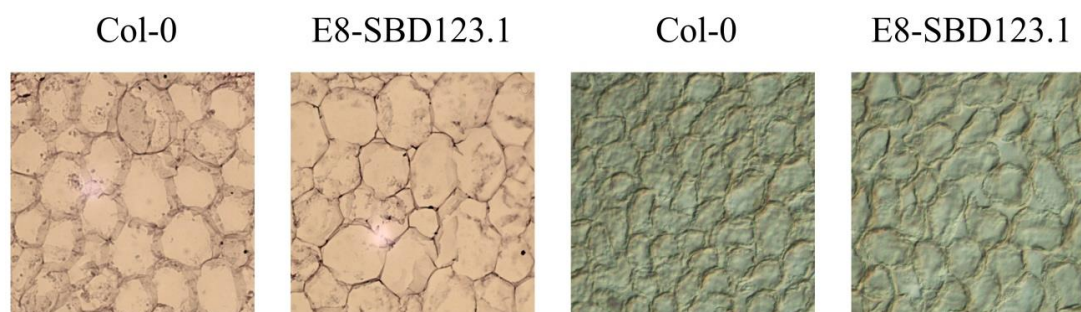
**Figura I-6 Determinación del tiempo de floración de plantas Col-0 y E8-SBD123.** Inspección visual de la aparición del brote apical en a) Col-0 a 22 días, y b) 24 días post-germinación; c) E8-SBD123.1 y d) E8-SBD123.2 a 22 días post-germinación. e) Determinación del número de hojas a través del tiempo en las líneas Col-0 (círculo negro), E8-SBD123.1 (círculo blanco) y E8-SBD123.2 (triángulo negro).



El cambio entre las etapas de crecimiento vegetativa y reproductiva es un evento importante en el ciclo de vida de las plantas. El tiempo de floración, el cual es modulado tanto por factores ambientales como endógenos, es un buen parámetro del estado de estrés de las plantas. En plantas crecidas bajo condiciones normales y un régimen de día largo, las flores de *A. thaliana* ecotipo Col-0 aparecen en el comienzo de la etapa 5 (a partir de las 3–4 semanas post siembra) (Koornneef, y col., 1991; Boyes, y col., 2001). Una vez que confirmamos que tanto Col-0 como ambas líneas transgénicas germinan al mismo tiempo, procedimos a evaluar el tiempo de floración a través de diversos enfoques tales como la determinación del número de hojas de roseta (Koornneef, y col., 1991), la determinación de la aparición del brote apical y del primer botón floral y la evaluación de la longitud del tallo (Weigel y Glazebrook, 2002) (Figura I-6). Hemos encontrado que la floración ocurre aproximadamente dos días antes en las líneas transgénicas que en plantas Col-0, sugiriendo que estas plantas cursan tempranamente el inicio del ciclo reproductivo.

#### **La expansión celular impulsa la producción de biomasa.**

El parénquima en empalizada de la hoja es un tejido altamente organizado, con células verticalmente extendidas y pocos espacios intracelulares (Rymen, y col., 2010). De esta forma se considera que el área del limbo foliar totalmente desarrollado es equivalente al área celular transversal promedio, multiplicada por el número celular promedio (Horiguchi, y col., 2005). Por esto, hemos determinado dichos parámetros en las hojas 1 y 2 de plantas de *A. thaliana* correspondientes a la etapa 5 del desarrollo (Figura I-7) en la cual presentan completamente detenido su crecimiento (Tabla I-3). Encontramos un incremento de 1.4 veces en el área foliar



**Figura I-7 Observación microscópica de células sub-epidérmicas de *A. thaliana***

Las fotografías corresponden al parénquima en empalizada de hoja 1/2 (izquierda) y de parénquima medular de tallo (derecha) de plantas de 28 días. Se observa un aumento en el tamaño de las células pertenecientes a plantas E8-SBD123.1 en comparación con plantas silvestres (Horiguchi, G. et al. 2005).



	Col-0	E8-SBD123.1	E8-SBD123.2	P-value
Área celular (Hoja) (mm <sup>2</sup> )	0.00213 <sup>(a)</sup>	0.00284 <sup>(b)</sup>	0.00294 <sup>(b)</sup>	<0.001 <sup>†</sup>
Área foliar (mm <sup>2</sup> )	36.595 ± 4.242 <sup>(a)</sup>	50.288 ± 0.578 <sup>(b)</sup>	51.376 ± 7.957 <sup>(b)</sup>	0.023
nº celular	16729	17011	15342	0.629 <sup>†</sup>
Área celular (Tallo) (mm <sup>2</sup> )	0.00136	0.00174	0.00175	0.002 <sup>†</sup>

**Tabla I-3 Área celular promedio en hoja y tallo de líneas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 y E8-SDB123.**

Todas las comparaciones fueron llevadas a cabo mediante un ANOVA ( $\alpha=0.05$ ), salvo cuando se indique el uso de un ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wallis) (<sup>†</sup>). (a) o (b) fueron usados para asilar los grupos que difieren de otros, a partir de un test de comparaciones múltiples (Tukey).

de ambas líneas transgénicas aproximadamente, el cual se encuentra completamente explicado por un aumento concordante del área celular promedio. No hubo diferencias en el número celular entre las líneas silvestres y transgénicas.

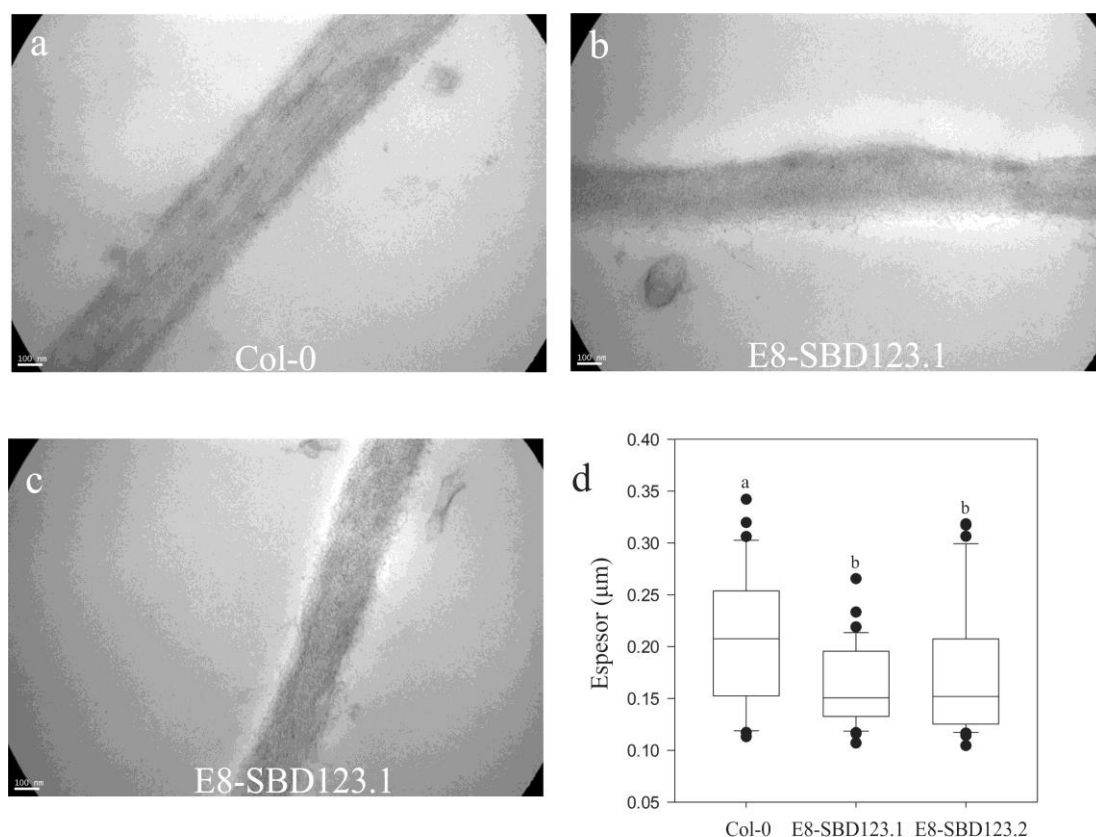
Debido a que el tejido parenquimático medular del tallo se considera bien definido, hemos determinado también el área celular promedio en las células de este órgano (Tabla I-3). Encontramos un aumento de 1.3 veces del área celular de las líneas E8-SBD123.1 y E8-SBD123.2 respecto de las Col-0.

Además, hemos determinado el espesor de la pared celular primaria en el tallo de plantas en crecimiento (etapa 3) a través de microscopía de transmisión electrónica (MTE) (Turner y Somerville, 1997) (Figura I-8) encontrando una reducción del 27% en el espesor de la pared celular en ambas líneas E8-SBD123 comprado con plantas silvestres.

Estos resultados obtenidos tanto en tallos como en hojas sugieren que el cambio en la biomasa de las líneas transgénicas es debido principalmente al incremento de la expansión celular, en lugar de un aumento en la proliferación celular.

### **Los componentes de la pared celular se encuentran alterados en las plantas transgénicas.**

Las paredes celulares sufren cambios dinámicos durante la expansión celular a fin de adquirir las propiedades mecánicas requeridas para el crecimiento. De esta manera, llevamos a cabo un análisis detallado de los componentes de la pared celular de células del tallo de plantas Col-0 y

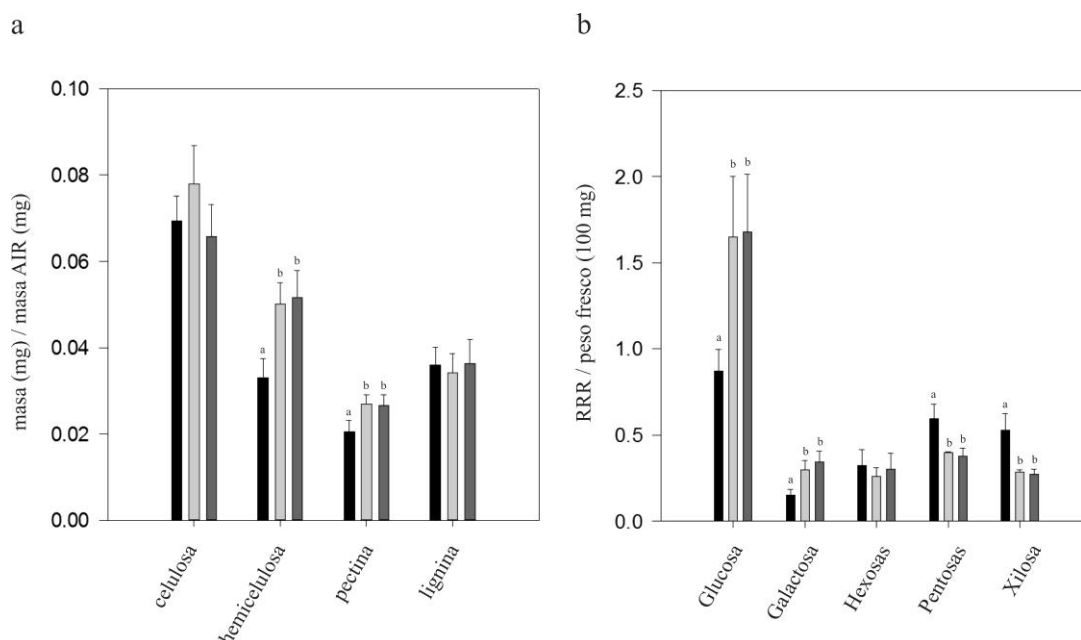


**Figura I-8 Microscopía de transmisión electrónica de paredes celulares de *Arabidopsis thaliana*.**

a) Col-0, b) E8-SBD123.1 y c) E8-SBD123.2. d) Gráfico de caja y bigotes (“Box plot”) representando todas las medidas de espesor de pared, en todas las líneas evaluadas. (a) o (b) fueron usados para aislar el grupo o los grupos que difieren de los otros, por medio de un test de comparaciones múltiples

expresantes de la construcción SBD123 utilizando ensayos enzimáticos (d'Amour, y col., 1993). La proporción de las diferentes fracciones de la pared celular fueron determinadas utilizando 100 mg de residuo insoluble a alcohol (AIR) como material inicial (Figura I-9a). Los contenidos de celulosa y ligninas de las paredes celulares silvestres y transgénicas fueron similares. Sin embargo, hemos detectado un incremento de 1.3 veces en el contenido de pectina, y un incremento de 1.5 veces en el contenido de hemicelulosas en las paredes celulares transgénicas comparadas con Col-0.

Además, hemos llevado a cabo estudios metabolómicos (GC-MS) de hidrolizados de la pared celular de hojas (Hoebler, y col., 1989) con el objetivo de evaluar si estas diferencias llevan a alteraciones en la composición de los azúcares de los polisacáridos de pared de las líneas



**Figura I-9 Composición de la pared celular de las líneas Col-0, E8-SBD123.1 y E8-SBD123.2.**

a) Análisis de la composición de la pared celular del tallo de plantas Col-0 (negro), E8-SBD123.1 (gris claro) y E8-SBD123.2 (gris oscuro). b) Perfil de monosacáridos obtenidos por GCMS de un hidrolizado de pared celular. El factor de respuesta relativa (“relative response ratio”; RRR) es proporcional a 100 mg de peso fresco. Los datos presentados corresponden a un promedio de cuatro réplicas biológicas. Los datos que se muestran son los promedios  $\pm$  SD de tres réplicas biológicas. (a) o (b) fueron usadas para aislar el o los grupos que difieren de otros mediante un test de comparaciones múltiples (Tukey) luego de un análisis estadístico con  $\alpha=0.05$ .

transgénicas (Minic, y col., 2009). Los resultados muestran un incremento, tanto en los contenidos de glucosa (1.9 veces para E8-SBD123.1 y E8-SBD123.2) y galactosa (2.0 veces y 2.3 veces para E8-SBD123.1 y E8-SBD123.2, respectivamente), como una disminución en el contenido de xilosa (aproximadamente 0.5 veces para E8-SBD123.1 y E8-SBD123.2) y en el contenido del pool de pentosas no resueltos (aproximadamente 0.6 veces para E8-SBD123.1 y E8-SBD123.2) en plantas transgénicas comparadas con plantas silvestres (ver Figura I-9 b).

Simultáneamente, hemos cuantificado enzimáticamente el porcentaje de glucosa total liberada en base al porcentaje de celulosa hidrolizada por las plantas transgénicas, comparadas con Col-0, de acuerdo a Larran et al. (Larran, y col., 2015). Mientras que este valor ronda el 85% ( $85.6 \pm 4.6$ ) en plantas silvestres, es mayor al 97% en ambas líneas transgénicas (E8-SBD123.1:  $97.2 \pm 2.4$ ; E8-SBD123.2:  $98.0 \pm 5.3$ ). De esta manera, las plantas E8-SBD123 liberan un 12% más de unidades de glucosa que las plantas silvestres.

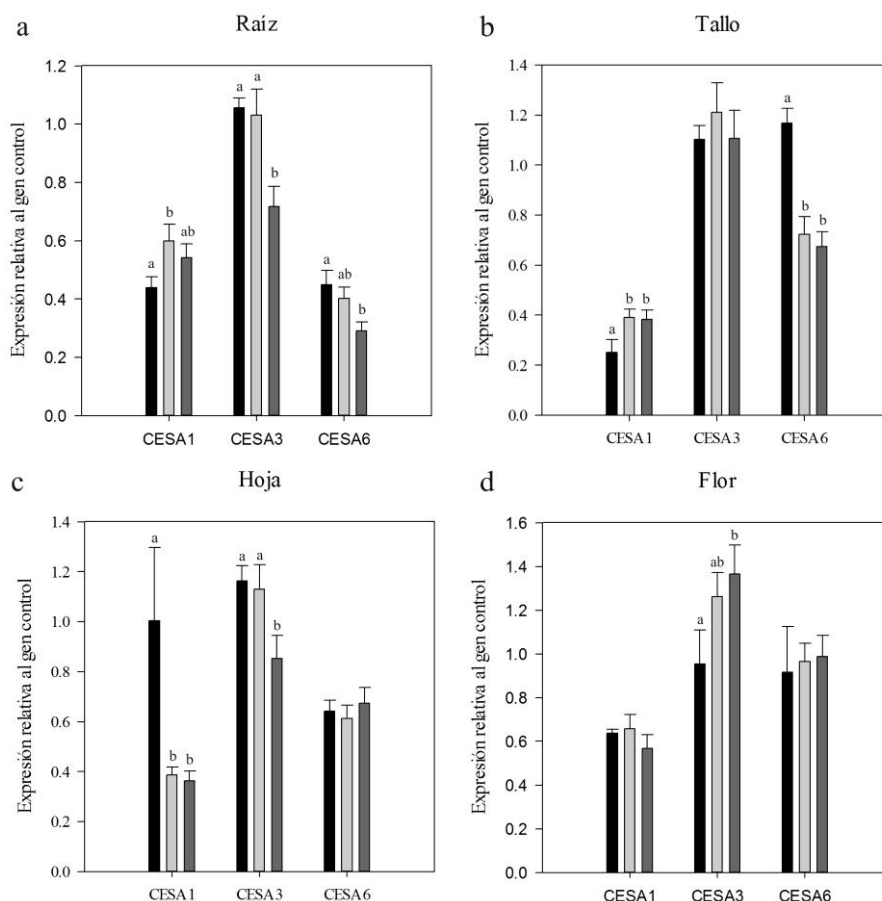
## Respuesta transcripcional de los genes involucrados en la síntesis y degradación de celulosa y hemicelulosas

Se realizaron estudios de expresión mediante qPCR de los transcritos de genes que codifican proteínas involucradas en la síntesis de pared primaria (celulosas, hemicelulosas y pectinas) y secundaria (celulosas y ligninas). La evaluación de los niveles de cada transcrito fue llevada a cabo en los órganos donde existe una mayor expresión (según <http://bar.utoronto.ca/eplant/>).

La celulosa se sintetiza en la membrana plasmática por las enzimas celulosa sintasa (CESA). Las mismas se encuentran organizadas en complejos multiprotéicos CSC (“cellulose synthase complexes”). En *Arabidopsis thaliana* existen 10 isoformas de las cuales CESA1 (*locus ID*: AT4G32410), CESA3 (*locus ID*: AT5G05170) y CESA6 (*locus ID*: AT5G64740) se encuentran involucradas en la síntesis de la pared celular primaria (Watanabe, y col., 2015), mientras que CESA4 (*locus ID*: AT5G44030), CESA7 (*locus ID*: AT5G17420), y CESA8 (*locus ID*: AT4G18780) son requeridos para la producción de pared celular secundaria (Endler y Persson, 2011). Para que los complejos CSC sea funcionales, al menos tres isoformas deben interactuar para la producción normal de celulosa (Persson, y col., 2007).

En la Figura I-10 se detallan los niveles de expresión de genes involucrados en la síntesis de pared celular primaria evaluados en distintos órganos. Si agrupamos los tejidos según la contribución de la pared secundaria, observamos que en raíz (Figura I-10 a) existe alteración de los transcritos asociados a las isoformas CESA1, CESA3 (solo en E8-SBD123.2), y CESA6, mientras que en tallo (Figura I-10b), observamos una alteración de los transcritos de las isoformas CESA1 y CESA6. En el caso de hoja (Figura I-10c), podemos observar una alteración en el perfil de expresión de CESA1, y CESA3 (solo en E8-SDB123.2), mientras que en flor solo detectamos un aumento en la expresión de CESA3.

Estudios previos han demostrado que existen roles parcialmente redundantes entre las isoformas relacionadas a CESA6 (CESA2 y CESA5) (Desprez, y col., 2007; Persson, y col., 2007), consistentes con roles más especializados (Endler y Persson, 2011). CESA9 también presenta similitud de secuencia con CESA6, aunque se expresa principalmente durante el desarrollo floral (Persson, y col., 2007). Sin embargo, se ha encontrado asociación de CESA9 con la síntesis de celulosa en la pared secundaria (Stork, y col., 2010) aportando un nivel de complejidad mayor a la interacción de estas isoformas. Con el objetivo de explicar la alteración en los niveles de expresión de CESA6 en los tejidos donde la contribución de la pared secundaria es mayor, decidimos evaluar la expresión de los genes relacionado a CESA6. En la Figura I-11, se puede

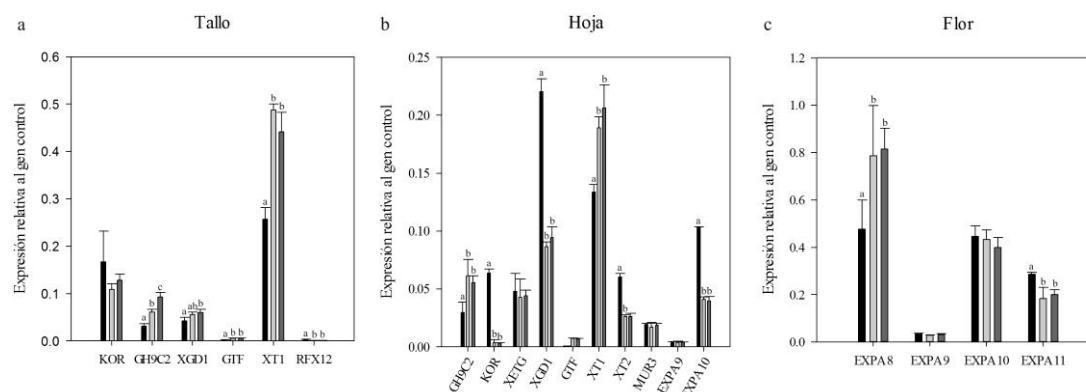


**Figura I-10 Perfiles de expresión de los genes involucrados en el metabolismo de pared celular primaria.**

Se muestra la expresión relativa de cada transcripto en las líneas Col-0 (negro), E8-SBD123.1 (gris claro), y E8-SBD123.2 (gris oscuro). Todos los genes fueron evaluados por qPCR en Tiempo Real, utilizando el gen de  $\beta$ -ACT como control interno, y fueron informados mediante la técnica del  $\Delta$ Ct. Los transcriptos fueron evaluados en los tejidos en los cuales fue confirmada su expresión, según <http://bar.utoronto.ca/eplant/>. En todos los casos, se probó el supuesto de homocedasticidad, y fue utilizado un ANOVA paramétrico en el caso que se cumpla, o un ANOVA no paramétrico en el caso contrario. Los datos presentados corresponden a un promedio de al menos tres réplicas biológicas. Los datos que se muestran son los promedios  $\pm$  SD de tres réplicas biológicas. (a) o (b) fueron usadas para aislar el o los grupos que difieren de otros mediante un test de comparaciones múltiples (Tukey) luego de un análisis estadístico con  $\alpha=0.05$ .

observar que la expresión de los genes evaluados corresponde a la expresión relativa según <http://bar.utoronto.ca/eplant/>.

En raíz y tallo (Figura I-11a), se observa un aumento de la expresión relativa de *CESA2* y *CESA9* en ambas líneas transgénicas. De esta manera, la expresión en raíz de *CESA2* es de 1.2 veces en E8-SBD123.1 y de 1.5 veces en E8-SBD123.2; y la expresión de *CESA9* es de 1.8



**Figura I-12 Perfiles de expresión de los genes que codifican enzimas de remodelación de la pared celular.**

Se muestra la expresión relativa de cada transcripto en las líneas Col-0 (negro), E8-SBD123.1 (gris claro), y E8-SBD123.2 (gris oscuro). Todos los genes fueron evaluados por qPCR en Tiempo Real, utilizando el gen de  $\beta$ -ACT como control interno, y fueron informados mediante la técnica del  $\Delta$ Ct. En todos los casos, se probó el supuesto de homocedasticidad, y fue utilizado un ANOVA paramétrico o no paramétrico, según corresponda. Los datos presentados corresponden a un promedio  $\pm$  SD de tres réplicas biológicas. (a), (b), (ab) o (c) fueron usadas para aislar el o los grupos que difieren de otros mediante un test de comparaciones múltiples (Tukey) luego de un análisis estadístico con  $\alpha=0.05$ .

veces en E8-SBD123.1 y de 2.0 veces en E8-SBD123.2 en comparación con Col-0. En tallo, la expresión de *CESA2* es de 1.5 veces en E8-SBD123.1 y E8-SBD123.2; mientras que la expresión de *CESA9* es de 1.5 veces en E8-SBD123.1 y de 1.9 veces en E8-SBD123.2 en comparación con Col-0. Además, observamos que *CESA5* no presenta modificaciones en su nivel de expresión en ningún órgano evaluado y que en hoja no se observa variación en la expresión de las isoforma de *CESA6* evaluadas. Esto nos sugiere que la disminución en la expresión de *CESA6* en raíz y tallo, podría ser compensada por la expresión de genes que codifican isoformas complementarias, como *CESA2* y *CESA9*.

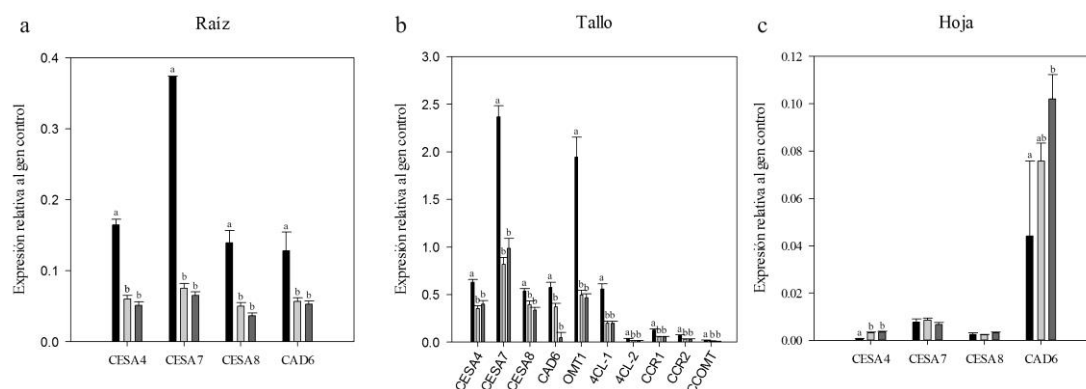
Debido a que encontramos una alteración en los niveles de hemicelulosas y en el patrón de monosacáridos obtenidos por hidrólisis de la pared de tallo, decidimos analizar la expresión de genes involucrados en la síntesis de las mismas. Todos los genes de remodelación de pared (Tabla 1 Anexo I) fueron evaluados en los tres tejidos de la Figura I-12, informándose sólo en los que se detectó el transcripto.

En el caso del tallo (Figura I-12a), observamos un aumento en la expresión de genes que codifican proteínas tales como una glucosil hidrolasa extracelular (GH9C2; AT1G64390); una

xilogalacturonano xilosiltransferasa relacionada con la síntesis de pectinas (XGD1; AT5G33290); una glucosiltransferasa de membrana (GTF; AT3G42180); una UDP-xilosil transferasa (XT1; AT3G62720) específica para oligosacáridos con grado de polimerización mayor a 4 (Culbertson, y col., 2016) y una xilanasa específica para haces vasculares RXF12 (ATXYN1; AT1G58370) (Suzuki, y col., 2002). La expresión de algunos de estos genes, también se vio modificada en hojas de roseta de todas las líneas evaluadas. Por ejemplo, se observó un aumento en la expresión de *GH9C2*, *XT1* y de *GTF*, pero una disminución de la expresión *XGD1*. También observamos una disminución significativa en la expresión de genes que codifican para una celulasa de membrana “Korrigan” (KOR; AT5G49720) (von Schaewen, y col., 2015), una xilosil transferasa 2 (XT2; AT4G02500) (Culbertson, y col., 2016) y una expansina de expresión en hoja de roseta denominada EXPA10 (AT1G26770). No se observaron alteraciones en los niveles de transcritos de los genes *EXPA9* (AT5G02260) (Lee, y col., 2001), *MUR3*, una xiloglucano galactosil-transferasa de membrana localizada en el aparato de Golgi (AT2G20370) (Tedman-Jones, y col., 2008) y *XETG* (AT2G14620), que codifica una xiloglucano endotransglucosilasa involucrada en la remodelación de la pared celular (Minic y Jouanin, 2006).

Por último en la Figura I-12c observamos una alteración en la expresión de dos expansinas *EXPA8* (AT2G40610) y *EXPA11* (AT1G20190) en flor. Llamativamente, estos genes se encuentran involucrados en la relajación de la pared celular asociada al crecimiento e inducida por brasinoesteroides (Guo, y col., 2009b). De esta manera, podemos suponer que su disminución podría estar relacionada con el aumento de expansión celular observado en las líneas transgénicas.

En la Figura I-13 se presenta la expresión de genes asociados a la síntesis de pared secundaria. Como puede observarse, los niveles de expresión de estos genes son mayores en órganos como raíz y tallo que en hoja. De esta manera, en estos dos órganos de las plantas E8-SBD123.1 y E8-SBD123.2 se observa una disminución en la expresión de todos los genes analizados asociados a esta vía en comparación con plantas silvestres. Los genes que codifican las celulosas sintetas asociadas a pared secundaria, *CESA4* (AT5G44030), *CESA7* (AT5G17420) y *CESA8* (AT4G18780) (Endler y Persson, 2011) presentan una disminución evidente en raíz y tallo, mientras que en hoja no presentan alteraciones en su expresión, a excepción de *CESA4*, el cual aumenta su expresión aproximadamente 0.5 veces en E8-SBD123.1 y E8-SBD123.2.



**Figura I-13 Perfiles de expresión de los genes que codifican enzimas de síntesis de pared secundaria.**

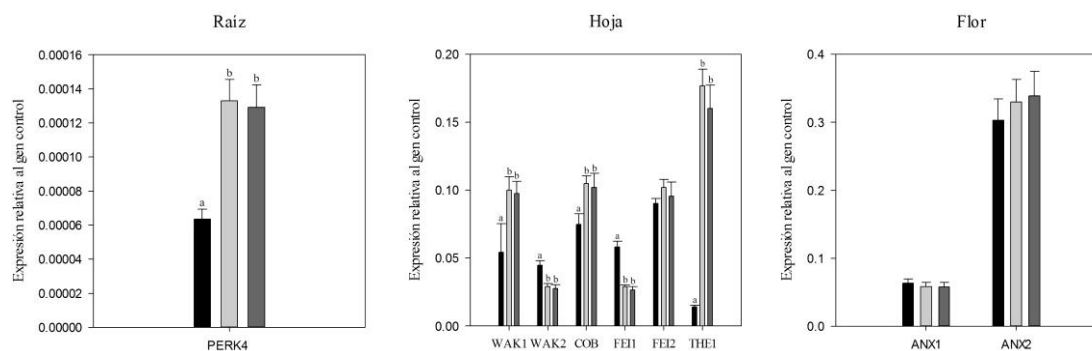
Se muestra la expresión relativa de cada transcripto en las líneas Col-0 (negro), E8-SBD123.1 (gris claro), y E8-SBD123.2 (gris oscuro). Todos los genes fueron evaluados por qPCR en Tiempo Real, utilizando el gen de  $\beta$ -ACT como control interno, y fueron informados mediante la técnica del  $\Delta$ Ct. En todos los casos, se probó el supuesto de homocedasticidad, y fue utilizado un ANOVA paramétrico o no paramétrico, según corresponda. Los datos presentados corresponden a un promedio de tres réplicas biológicas. Los datos que se muestran son los promedios  $\pm$  SD de tres réplicas biológicas. (a), (b), (ab) o (c) fueron usadas para aislar el o los grupos que difieren de otros mediante un test de comparaciones múltiples (Tukey) luego de un análisis estadístico con  $\alpha=0.05$ .

Previamente se han reportado casos de alteración conjunta en de las vías metabólicas de ligninas, hemicelulosas, pectinas y celulosa. Wrobel-Kwiatkowska y colaboradores (Wrobel-Kwiatkowska, y col., 2007), demostraron que la disminución en la síntesis de ligninas, por deficiencia de CAD6 de *Linum usitatissimum*, se asocia a una conjunta disminución en los niveles de hemicelulosas y pectinas, pero no de celulosa. Por ello, y a pesar de que no se detectaron diferencias en los niveles de ligninas entre las líneas E8-SBD123 y Col-0, procedimos a evaluar algunos genes involucrados en la vía biosintética de la misma. Así, analizamos la expresión de los genes que codifican a una cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD6; AT4G34230), una o-metiltransferasa del ácido caféico (ATOMT1; AT5G54160), una 4-cumarato-CoA ligasa 1 (4CL-1; AT1G51680.1), una 4-cumarato-CoA ligasa 2 (4CL-2; AT3G21240), una cinamoil CoA reductasa 1 (CCR1; AT1G15950.1), una cinamoil CoA reductasa 2 (CCR2; AT1G80820.1) y una cafeoil-CoA O-metiltransferasa (CCOMT; AT1G67980) (Vanholme, y col., 2010) en tallo. En la Figura I-13b, se observa una significativa disminución en la expresión de estos genes en las líneas transgénicas, en comparación con Col-0.



Debido a la evidente modificación de la pared celular de estas plantas, decidimos evaluar los niveles de expresión de genes codificantes para proteínas sensoras de la integridad de la pared celular. Estas proteínas de membrana poseen un dominio asociado a la pared y transducen señales a través de un dominio citoplasmático con actividad quinasa, produciendo una respuesta celular específica (Ringli, 2010). Las señales asociadas con COBRA (AT5G60920), FEI1 (AT1G31420) y FEI2 (AT2G35620) no se conocen, pero si se sabe que la activación de estos receptores produce una reorientación de las microfibrillas de celulosa (COB) y en el contenido total de este polímero (FEI1 y 2). Se cree que THE1 (AT5G54380.1) es capaz de evaluar los niveles de celulosa de la pared celular (Pilling y Hofte, 2003; Guo, y col., 2009b) y provocar una respuesta parcialmente solapada con la respuesta a brasinoesteroides involucrada en la elongación celular (Guo, y col., 2009a). Según evidencias obtenidas por Hematy y colaboradores (Hematy, y col., 2007a) una alteración significativa en la estructura de la pared implicaría un arresto en el crecimiento celular mediado por THE1. Por otro lado, se conoce que algunos de estos receptores presentan una expresión órgano-específica. Tal es el caso de PERK4 (AT2G18470), que se expresa principalmente en raíz y de ANX1 AT3G04690) y ANX2 (AT5G28680), que se expresan en flor. El primero se encuentra relacionado al crecimiento de la raíz asociado a los niveles de pectina, mientras que los ANX registran la resistencia de la pared al crecimiento del tubo polínico (Ringli, 2010). Por último, WAK 1 (AT1G21250.1) y WAK2 (AT1G21270) son receptores asociados a pectinas que son conocidos activadores de la vía de las MAPK afectando la turgencia vacuolar por la regulación de la expresión de la enzima invertasa-vacuolar, que degrada la sacarosa en glucosa y fructosa aumentando el potencial hídrico de la vacuola, y en consecuencia el turgor celular (Ringli, 2010).

En la Figura I-14a, se observa que el gen que codifica al receptor PERK-4 específico de raíz y capaz de inhibir la elongación celular en respuesta a ABA (Bai, y col., 2009), presenta un mayor nivel de expresión en ambas líneas transgénicas en comparación con Col-0. En la Figura I-14b, observamos que en las hojas de las líneas E8-SBD123, se evidencia una disminución en los niveles de los transcritos de WAK2 y FEI1, en comparación a las plantas silvestres. Por otro lado, en este mismo órgano, se observa un aumento significativo de la expresión de los genes WAK1, COB y THE1 en las líneas transgénicas. El llamativo aumento en la expresión de THE1 (12.4 veces para E8-SBD123.1 y 11.3 veces para E8-SBD123.2), y de PERK4 en raíz (2.0 veces en ambas líneas E8-SBD123 en comparación con Col-0), sugieren una posible respuesta de expansión mediada por brasinoesteroides (Guo, y col., 2009a; Guo, y col., 2009b; Ringli, 2010) y auxinas (Bai, y col., 2009), respectivamente.

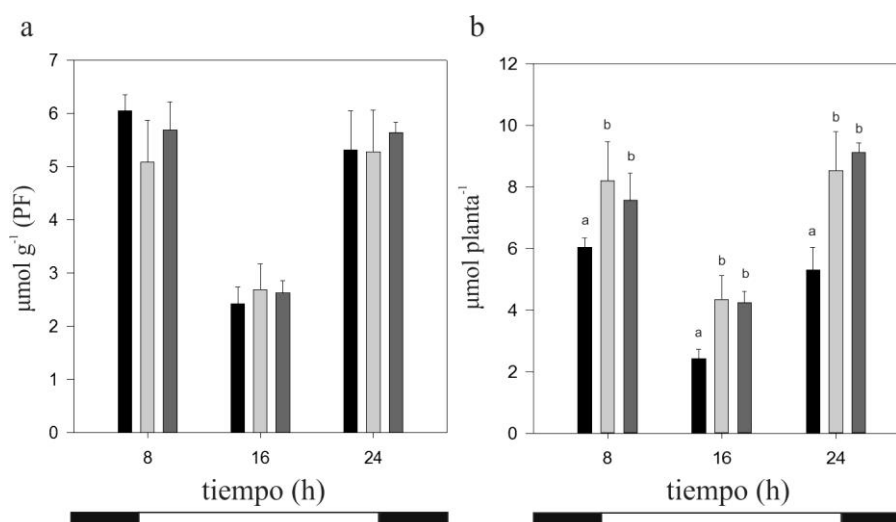


**Figura I-14 Perfiles de expresión de los genes que codifican para receptores asociados a pared celular.**

Se muestra la expresión relativa de cada transcripto en las líneas Col-0 (negro), E8-SBD123.1 (gris claro), y E8-SBD123.2 (gris oscuro). Todos los genes fueron evaluados por qPCR en Tiempo Real, utilizando el gen de  $\beta$ -ACT como control interno, y fueron informados mediante la técnica del  $\Delta$ Ct. En todos los casos, se probó el supuesto de homocedasticidad, y fue utilizado un ANOVA paramétrico o no paramétrico, según corresponda. Los datos presentados corresponden a un promedio de tres réplicas biológicas. Los datos que se muestran son los promedios  $\pm$  SD de tres réplicas biológicas. (a), (b), (ab) o (c) fueron usadas para aislar el o los grupos que difieren de otros mediante un test de comparaciones múltiples (Tukey) luego de un análisis estadístico con  $\alpha=0.05$ .

### *Las plantas transgénicas son más susceptibles a la digestión que las plantas Col-0.*

Debido a que observamos una alteración en la composición y en la estructura de las paredes celulares de las líneas transgénicas, decidimos investigar la integridad de las mismas y su susceptibilidad a ser degradadas. En este estudio, utilizamos dos enfoques para evaluar la integridad de la pared celular. En primer lugar, hemos construido una curva dosis-respuesta utilizando una combinación de celulasa y macerozima (Yoo, y col., 2007) para obtener protoplastos utilizando un protocolo estándar (referido como 1) y diferentes combinaciones de estas enzimas (ver materiales y métodos), asumiendo que el número de protoplastos obtenidos será proporcional a la digestibilidad de la pared celular en cada planta. Como se muestra en la Figura I-15a el número de protoplastos es significativamente mayor en ambas líneas transgénicas comparadas con las plantas silvestres, en tres de las cuatro condiciones analizadas (0.5; 1.0; y 2.0). Esto sugiere que las plantas E8-SBD123 son más sensibles a la digestión que Col-0. En segundo lugar, hemos llevado a cabo un ensayo de digestibilidad *in vitro* para determinar si este comportamiento también se obtendría en un sistema de digestión similar a uno *in vivo*, utilizando una adaptación del proceso de digestión ruminal (Tilley y Terry, 1963). De esta manera, encontramos un aumento significativo (1.28 veces) en la digestibilidad de la materia seca de la línea E8-SBD123.1, un incremento de 1.17 veces en la línea E8-SBD123.2



**Figura I-15 Contenido de azúcar fermentable determinado enzimáticamente.**

Las medidas fueron obtenidas en distintos puntos del día (ciclo luz – oscuridad 16h/8h) en plantas Col-0 (negro), E8-SBD123.1 (gris claro) y E8-SBD123.2 (gris oscuro). a) Contenido de azúcares fermentables ( $\mu\text{mol}$ ) por unidad de masa (g) de peso fresco b) Contenido total de azúcares fermentables por planta evaluada en tres puntos del día: final de la noche, mediodía y final del día. (a) o (b) fueron usadas para aislar el o los grupos que difieren de otros mediante un test de comparaciones múltiples (Tukey) luego de un análisis estadístico con  $\alpha=0.05$ .

(ver Figura I-15b) comparado con Col-0, lo que indicaría que las líneas transgénicas son más propensas a ser degradadas por procesos enzimáticos externos que Col-0.

### Los niveles de azúcar fermentables aumentan como consecuencia del incremento de la biomasa

Como se mostró anteriormente (Figura I-9 b), la cantidad de azúcares liberada por la hidrólisis ácida de la pared celular fue mayor para las líneas transgénicas que para la silvestre. Específicamente, existió un incremento en los niveles de glucosa y galactosa y una disminución en los niveles de xilosas liberados al finalizar la hidrólisis ácida. Por otra parte, cuando el total de extractos no hidrolizados fueron analizados mediante un enfoque enzimático (Bergmeyer, 2012) en tres puntos a lo largo del día (final de la noche, mediodía y final del día), las plantas transgénicas y silvestres no difirieron en términos de contenido de azúcar fermentable por peso fresco (Figura I-16a). Sin embargo, existió un incremento de este parámetro por planta en las líneas transgénicas, el cual sería impulsado predominantemente por el incremento en la biomasa ( $P < 0.001$ ; Figura I-16b).

## Discusión:

Los análisis comparativos de la adsorción de los dominios SBD123 de AtSSIII a distintos polisacáridos indicaron que éstos presentan un grado de promiscuidad de unión a diferentes sustratos. Hemos analizado la forma y la composición de los sitios de unión a polisacáridos de enzimas involucradas en el metabolismo de xilano en la pared celular de plantas, construyendo alineamientos de los CBM caracterizados y comparando sus sitios de unión con los existentes en los SBD. Usando las secuencias de tres CBM de xilanasas de *A. thaliana* (AT1G58370, NP\_176133.1, AB008015), *Polyplastron multivesiculatum* (CAL91978.1), *Carica papaya* (AAN10199.1), *Ampullaria crossean* (AAP31839.2) y *Thermotoga maritima* (AAD35155), los cuales, son miembros de la familia CAZy CBM22 ([http://www.cazy.org/CBM22\\_eukaryota.html](http://www.cazy.org/CBM22_eukaryota.html)), encontramos que los residuos Y394, W340 y W366 alinean con residuos involucrados en la unión de xilano (Araki, y col., 2006; Berrin y Juge, 2008; Pollet, y col., 2009). Adicionalmente, el residuo W366 de SBD123 alinea con el W575 de la endo-(1,4)- $\beta$ -D-glucanasa de *A. thaliana* (AT1G64390), involucrada en la degradación de la pared celular y que presenta afinidad por celulosa (Simpson y Barras, 1999).

De esta forma, además de ser capaz de unirse a almidón, podemos decir que los dominios SBD123 se unen a los polisacáridos de pared, tales como xilano, pectina y celulosa con diferentes afinidades, las cuales son aún mayores que la afinidad por su sustrato natural.

Basado en los resultados obtenidos, hemos investigado el uso potencial de estos tres dominios SBD *in tándem* para obtener plantas transgénicas con un fenotipo de interés agronómico. Las plantas E8-SBD123 producidas en esta tesis presentan un incremento en la biomasa debido a un incremento en la expansión celular y una alteración en la composición de la pared celular, lo que conlleva a una disminución en la integridad de la misma y a un incremento en las cantidades de azúcares fermentables liberadas por hidrólisis ácida, comparada con plantas silvestres. Se han llevado a cabo varios intentos para aumentar la biomasa y aumentar la producción de biocombustibles a través del uso de diversas herramientas y especies de plantas. Doblin y col. (Doblin, y col., 2014), Kalluri y col. (Kalluri, y col., 2014) y Loqué y col. (Loque, y col., 2015) dirigen varias proteínas a la pared celular, entre ellas enzimas y transportadores involucrados en la conversión de azúcar nucleótidos, enzimas que modifican y generan polisacáridos, o trabajan con factores de transcripción que controlan la expresión de genes que codifican con enzimas claves. Entre algunos ejemplos podemos incluir (i) la sobreexpresión de la hidroxicinamoil-CoA hidratasa, la cual aumenta la sacarificación y reduce el grado de polimerización de lignina en *A. thaliana* (Eudes, y col., 2012) y (ii) la sobreexpresión del factor

de transcripción Myb, PvMYB4, el cual aumenta los rendimientos de etanol entre 2 y 6 veces obtenidos a partir de *Panicum virgatum* (Shen, y col., 2013). Otro enfoque involucra la sobreexpresión de transportador UDP-galactosa, alterando la composición de la pared celular a través de la manipulación de la vía de conversión de azúcar-nucleótido (Rautengarten, y col., 2014). Por otro lado, el silenciamiento de genes codificantes de glucosiltransferasas involucradas en la biosíntesis de xilano en álamo (*Populus tremula*) (IRX8) causa una reducción significativa en el contenido de xilano y aumenta los rendimientos de glucosa liberada (Biswal, y col., 2015). El uso de módulos de unión a carbohidratos para modificar la pared celular de plantas, también ha sido explorado previamente (Shoseyov, y col., 2001; Levy, y col., 2002; Shoseyov, y col., 2006; Obembe, y col., 2007; Nardi, y col., 2015). Sin embargo, este trabajo representa el novedoso uso de dominios de unión a almidón de enzimas de plantas.

Cuando la pared celular se expande, las microfibrillas de celulosa se deslizan entre ellas utilizando la presión de turgor como fuerza motriz, hasta que se alcanza un equilibrio con la resistencia mecánica de la pared. Esta observación explica por qué las enzimas no hidrolíticas del tipo “cuña” favorecen la expansión celular (Cosgrove, 1993; Marga, y col., 2005), como por ejemplo el dominio CBMCex (xilanasas Cex; P07986; *Cellulomonas fimi*), el cual puede moverse a lo largo de la superficie del sustrato (Jervis, y col., 1997). De esta forma, puede trazarse un paralelo entre las acciones de los CBM expresados en la pared celular, y proteínas con efecto de relajación de la pared celular llamadas expansinas (Shoseyov, y col., 2006). Es más, la estructura mínima para relajar la pared celular, requerida por la proteína alergénica tipo expansina Phl p2 (UniProt ID: P43214) de *Phleum pratense*, es un CBM (Shoseyov, y col., 2006). Notablemente, la estructura de este CBM, tal como los SBD, se encuentra definida por dos sitios de unión a sustrato, los cuales permiten que la proteína se deslice entre dos cadenas de polisacáridos (Tormo, y col., 1996; Southall, y col., 1999). Estudios previos sugirieron que la presencia de los dominios SBD de AtSSIII pueden actuar *in trans* reestableciendo, al menos parcialmente, la actividad enzimática del dominio catalítico (CD) de esta enzima en comparación con la AtSSIII entera (Wayllace, y col., 2010). Este hecho nos permitiría sugerir que los SBD pueden actuar disruptivamente sobre los polisacáridos de la pared celular, promoviendo el deslizamiento entre fibrillas de celulosa y el ataque enzimático (Shoseyov, y col., 2006).

Las hemicelulosas ayudan a fortalecer la pared celular interaccionando con celulosa y, en algunas paredes, con lignina (Scheller y Ulvskov, 2010). La pectina se encuentra asociada a numerosos procesos fisiológicos tales como el crecimiento y desarrollo de la planta, defensa, adhesión y expansión celular, estructura y porosidad de la pared, señalización y crecimiento del

tubo polínico entre otros (Mohnen, 2008). De esta forma, se cree que la disrupción de la pared celular puede mitigarse, al menos parcialmente, por la alteración en los contenidos de pectina y hemicelulosas. Es llamativa la disminución en los niveles de xilosa obtenidos de la hidrólisis de pared celular si se comparan con los aumentos en los niveles de hemicelulosas, debido a que la hemicelulosa de *A. thaliana* se compone principalmente de xiloglucanos XXXG y en menor medida de xilano (Zabotina, 2012). Diversas especulaciones surgen para explicar este fenómeno. Por ejemplo, consideramos que en las plantas transgénicas la hemicelulosa se encuentra más expuesta a la degradación aumentando la fracción fácilmente hidrolizable (“easy-to-hydrolyse”) (Lavarack, y col., 2002). Es sabido que en las condiciones de hidrólisis la xilosa es degradada a diversos productos, siendo el furfural un intermediario (Banerji, y col., 2013). Lavarack y col (Lavarack, y col., 2002) han establecido diversos modelos en los que la xilosa proveniente de una fracción más accesible se descomponen más fácilmente en estos productos. Por otro lado, se sabe que la interacción entre la celulosa y el xiloglucano es capaz de influir en la expansión celular (Mortimer, y col., 2015). Por ejemplo, alteraciones en las estructuras de los XyG sugieren un rol en el mantenimiento de la fuerza de tensión después de crecimiento de la pared y no durante la desestructuración de la misma (Peña, y col., 2004). De esta forma, los XyG presentan una mayor cantidad de residuos de galactosa en tejidos en crecimiento para compensar la fuerza de tensión. El aumento en los niveles de galactosa obtenido en la hidrólisis de la pared de las líneas transgénicas bien pueden deberse a un aumento en el contenido de pectinas o a un aumento de ramificaciones de galactosa en los xiloglucanos como respuesta al incremento en el crecimiento por expansión.

Se cree que los CBM juegan cuatro roles básicos con respecto a los módulos catalíticos a los cuales se encuentran asociados: (i) un efecto de proximidad, (ii) funciones de orientación, (iii) funciones de disrupción, y (iv) adhesión (Boraston, y col., 2004; Montanier, 2009; Oliveira, y col., 2015). Así, el fenotipo de digestibilidad elevada de las líneas E8-SBD123 generadas en este trabajo puede atribuirse a la existencia de un efecto putativo de disrupción de pared ocasionado por la expresión de SBD123. Sin embargo, no podemos excluir la posibilidad de que la actividad de cualquiera de las enzimas degradativas utilizadas en estos estudios tenga un efecto diferencial en cada extracto de plantas. Por ejemplo, CBM aislados son capaces de alterar la actividad enzimática de enzimas como la glucógeno sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (Wayllace, y col., 2010). Además, los SBD podrían generar complejos que permitan la remodelación de la pared celular; esta función de andamiaje ha sido probada para enzimas del metabolismo del almidón (Hennen-Bierwagen, y col., 2008; Hennen-Bierwagen, y col., 2009).

La creciente industria de producción de etanol requiere el desarrollo de cultivares con grandes cantidades de biomasa y paredes celulares fácilmente fermentables (Nevoigt, 2008). En resumen, en este capítulo hemos encontrado que la proteína recombinante SBD123 puede unirse a los polisacáridos de pared con una mayor afinidad que a almidón. Además, cuando la proteína SBD123 fue expresada en la pared celular de plantas de *A. thaliana*, se observe una alteración en la composición de la pared celular y un incremento en la biomasa debido a un incremento en la expansión celular y a una reducción en la integridad de la pared. Estos resultados sugieren que estas plantas pueden tener una ventaja en la producción de bioetanol, en términos de la sacarificación de los sustratos esenciales. Además, el incremento en la digestibilidad enzimática de la biomasa, hace que estas plantas puedan presentarse como ventajas biotecnológicas prometedoras para la industria del alimento ganadero. Sin embargo, esta estrategia debe ser probada primeramente en especies de interés agronómico, como por ejemplo *Medicago sativa* y estudios adicionales deben llevarse a cabo para optimizar los cambios deseables.

## II. CAPÍTULO 2:

---

Caracterización de la partición de carbono entre polisacáridos de reserva y estructurales en plantas de *Arabidopsis thaliana* E8-SBD123.



## Introducción:

Las plantas producen grandes cantidades de polisacáridos, los cuales se encuentran involucrados en una plétora de procesos celulares, relacionados principalmente con funciones estructurales y de almacenamiento. Por ejemplo, el almidón es el principal polímero de reserva de carbono en plantas. En *Arabidopsis thaliana*, el almidón transitorio se acumula a través del día y es consumido a la noche. Por esta razón, la síntesis y degradación del mismo debe ser precisamente coordinada con el ciclo lumínico con el objetivo de evitar el hambre de carbono. Por otro lado, la pared primaria en la pared celular de plantas superiores contiene celulosa, pectina y hemicelulosas, cuya principal función es brindar el soporte estructural de los tejidos para soportar las fuerzas mecánicas a las cuales se encuentran expuestos. De esta manera, la homeostasis de polisacáridos debe ser rigurosamente regulada, especialmente durante la etapa de deposición de componentes durante el crecimiento celular (Wolf, y col., 2012).

Es evidente que el balance de precursores azúcar nucleótidos constituye la conexión metabólica entre estos polisacáridos aunque actualmente no está claro si la interconversión del consorcio de precursores es necesaria y suficiente para clasificarse como un paso de regulación homeostática (Wolf, y col., 2012). Por ejemplo, el conjunto de UDP-Glc libre es demasiado pequeño y debe ser compartido entre el aparato de Golgi y los procesos de biosíntesis de membrana plasmática (Wolf, y col., 2012). De esta manera la sacarosa, a pesar de ser la principal molécula implicada en la translocación de carbono entre los órganos fuente y sumidero, surge como un posible regulador de la partición del mismo, ya que está definitivamente involucrada en la síntesis de precursores para polisacáridos. Por ejemplo, la enzima p-SuSy (isoforma particulada de la sacarosa sintasa) se encuentra físicamente asociada con la celulosa sintasa (CESA) con el objetivo de canalizar directamente UDP-Glc a esta maquinaria biosintética, especialmente durante la síntesis de pared celular secundaria (Babb y Haigler, 2001; Haigler, y col., 2001). Además, en muchos tejidos sumideros los productos de la isoforma soluble de la sacarosa sintasa (s-SuSy) son utilizados en la síntesis de polímeros de reserva (Haigler, y col., 2001). Finalmente, el clivaje de la sacarosa por la invertasa ácida está directamente relacionada con el crecimiento y la expansión celular (Sturm y Tang, 1999).

Actualmente, los esfuerzos de las investigaciones industriales se encuentran enfocados en manipular estas vías metabólicas, para convertir la mayor proporción posible de carbono fotosintético en combustibles y químicos con valor agregado. Sin embargo, este objetivo normalmente se opone a la prioridad celular de sobrevivir y propagarse (Melis, 2013). En el capítulo anterior hemos probado que el incremento de la biomasa en las líneas E8-SBD123 se

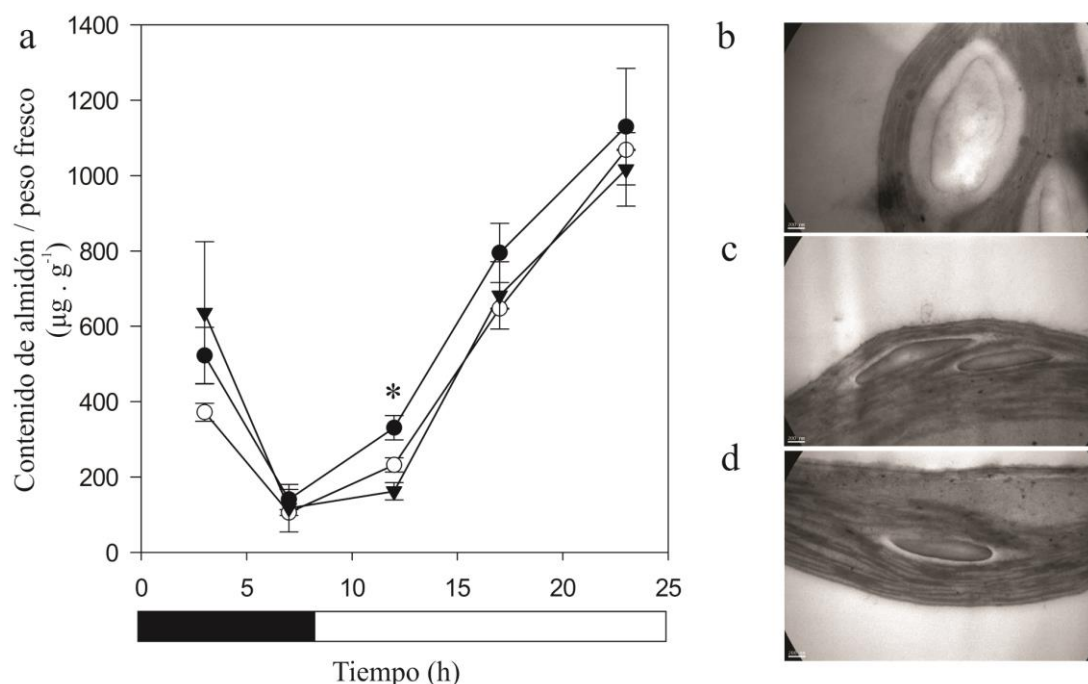
debe mayoritariamente a un incremento en la expansión celular, afectando la composición de la pared y su digestibilidad. De esta manera, en este capítulo nos centraremos en profundizar la caracterización molecular de las alteraciones morfológicas de estas plantas, enfocándonos en como el carbono fluye a los diferentes polisacáridos, con el objetivo de identificar nuevas herramientas biotecnológicas.

## Resultados:

**El contenido y la composición del almidón se encuentran alterados en las líneas transgénicas.**

### Contenido de Almidón.

Con el objetivo de determinar el contenido de almidón en las plantas transgénicas y control realizamos una cuantificación seriada del contenido total de almidón en hojas de *A. thaliana* en función del tiempo de acuerdo con Smith y Zeeman (Smith y Zeeman, 2006). En la Figura II-1a, se muestra una disminución en el contenido de almidón en las líneas E8-SBD123.1 y E8-



**Figura II-1 Caracterización del almidón de plantas E8-SBD123.**

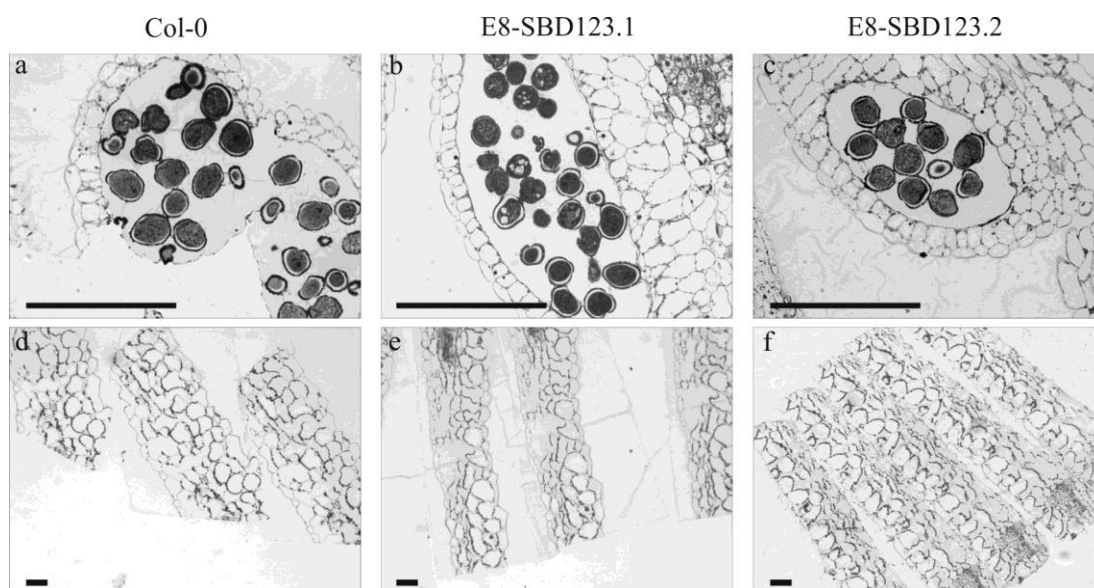
a) Cuantificación del almidón total en hojas de plantas Col-0 (círculo negro), E8-SBD123.1 (círculo blanco) y E8-SBD123.2 (triángulo negro). Imagen de MET de gránulos de almidón en cloroplastos de plantas Col-0 (b), E8-SBD123.1 (c) y E8-SBD123.2 (d)

SBD123.2, al principio del período de luz (12 h), en un ciclo de luz oscuridad de 16h/8h.

Con el propósito de analizar la composición del almidón de ambas líneas, se evaluó la relación amilosa/amilopectina mediante el método de Concanavalina A en plantas recolectadas a mitad del período luminoso (Gibson, y col., 1997), encontrando un contenido de amilosa de  $16.8 \pm 1.2$  % en plantas Col-0, y de  $30.9 \pm 4.1$  % en la línea E8-SBD123.1 y de  $20.6 \pm 1.9$  % en la línea E8-SDB123.2.

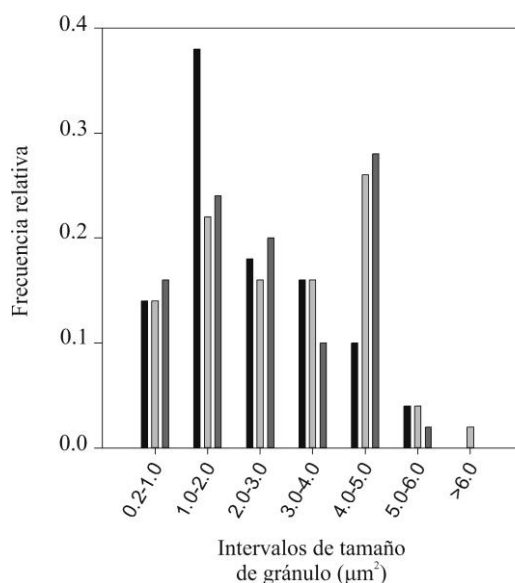
### Caracterización microscópica de los gránulos de almidón

La morfología del gránulo transitorio de almidón de *Arabidopsis thaliana* puede verse afectada tanto por una alteración en la relación amilosa/amilopectina, como por un cambio en el contenido total de almidón (Jenkins y Donald, 1995). Inicialmente, hemos utilizado MTE para evaluar las diferencias morfológicas entre los gránulos de almidón de ambos tipos de plantas. Imágenes de un conjunto de gránulos representativo se muestran en la Figura II-1b-d, en donde se observa que la mayoría son altamente electro-opacos en las líneas transgénicas (Figura II-1c-d), mientras que los gránulos control presentan una mayor variabilidad frente a este parámetro



**Figura II-2 Evaluación de tejidos maduros de plantas de *A. thaliana*.**

En a, b y c, se muestran los sacos polínicos de las tres líneas de plantas. En d, e y f se muestran secciones transversales de hojas de las plantas Col-0 y E8-SBD123. Los cortes semifinos fueron obtenidos con el ultramicrotomo (1 - 2 mm) para su estudio en microscopía óptica convencional (de campo claro), mediante la tinción con azul de toluidina. Barra = 50  $\mu$ m.



**Figura II-3 Comparación de los tamaños de los gránulos de almidón.**

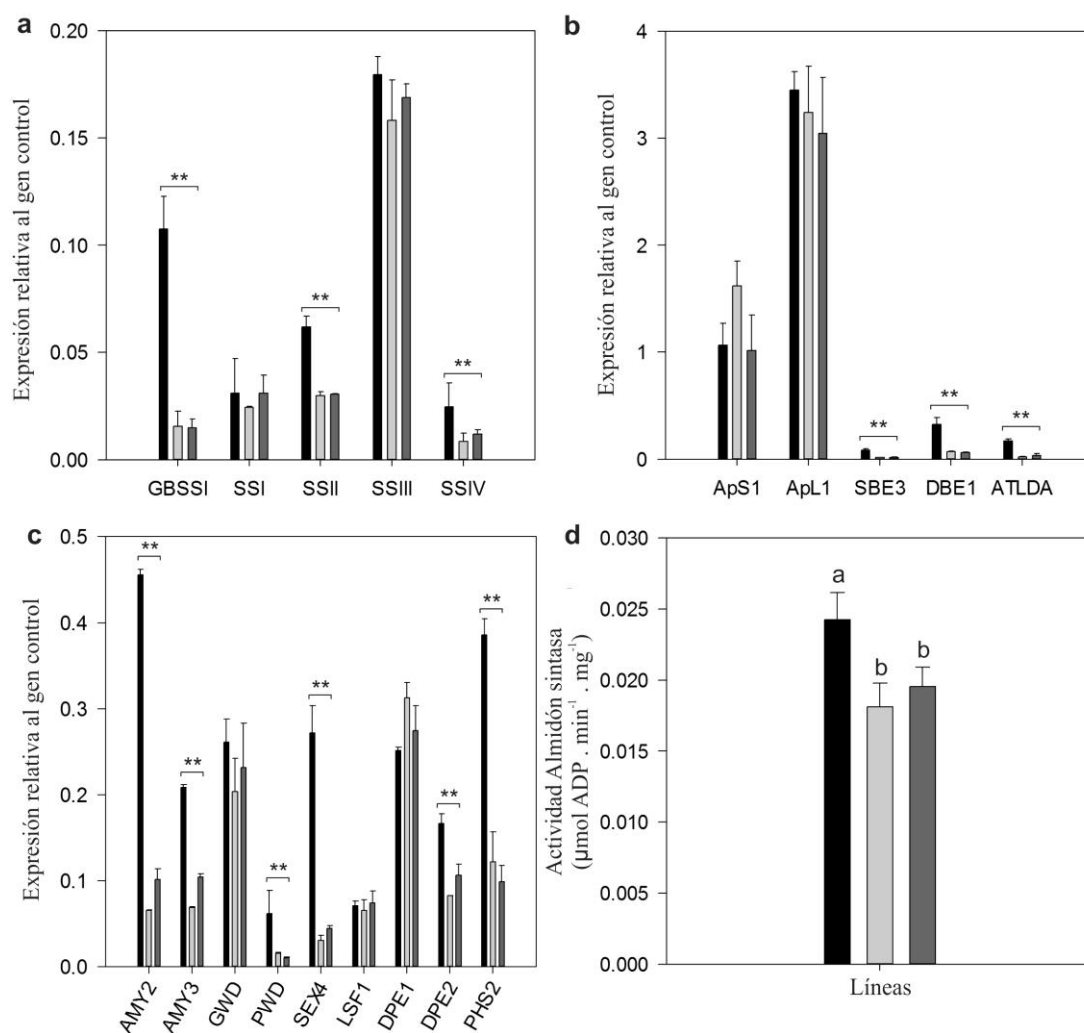
Histograma de frecuencias en intervalos definidos de tamaño de los gránulos de almidón, en plantas Col-0 (negro), E8-SBD123.1 (gris claro) y E8-SBD123.2 (gris oscuro).

(Figura II-1b). Subsecuentemente, hemos evaluado la organización de los tejidos maduros de *A. thaliana* transgénicas y control, utilizando secciones semifinas y teñidas con azul de toluidina, no observando mayores alteraciones (Figura II-2). Posteriormente, utilizamos MBE (Microscopía de barrido electrónico) sobre gránulos aislados con el fin de adquirir imágenes de los mismos. Las imágenes fueron evaluadas creando un histograma de frecuencias a partir del rango de distribución de tamaños de los gránulos. De esta manera, en la Figura II-3 se muestra un incremento en la frecuencia de gránulos de área entre  $4,0\text{-}5,0 \mu\text{m}^2$  a expensas de una disminución en la frecuencia de gránulos de  $1,0\text{-}2,0 \mu\text{m}^2$  de superficie. La circularidad es un parámetro adimensional, que depende del área y perímetro de un objeto, y define que tan cerca se acerca la forma de este cuerpo a un círculo (Ingkasuwan, y col., 2012). A pesar que este parámetro no representa la forma real de los gránulos, consideramos que es útil con propósitos comparativos. De esta manera, la circularidad de los gránulos fue evaluada, no encontrando diferencias significativas entre las líneas control y transgénicas ( $0,900 \pm 0,027$  para Col-0,  $0,896 \pm 0,032$  para E8-SBD123.1 y  $0,873 \pm 0,049$  para E8-SBD123.2).

### Contenido de Almidón Resistente

Existe una fracción del almidón que no puede ser hidrolizada en el tracto digestivo sin sufrir previamente una dispersión química, por lo cual pasa directamente al colon. Ahí, esta fracción

es fermentada formando ácidos grasos de cadena corta (SCFA), los cuales promueven la función óptima de los intestinos (Rahman, y col., 2007). El término acuñado para esta fracción, es Almidón Resistente (RS) (Englyst y Englyst, 2005) y se considera que el mismo contribuye al contenido total de fibra en la dieta humana. El almidón resistente es una molécula lineal de  $\alpha$ -1,4-D-glucano de un peso molecular relativamente bajo (1.2 - 105 Da) derivado principalmente de la fracción de amilosa (Tharanathan, 2002). Con el objetivo de continuar la caracterización



**Figura II-4 Caracterización del metabolismo de almidón en hojas de líneas Col-0 (negro), E8-SBD123.1 (gris claro) y E8-SBD123.2 (gris oscuro).**

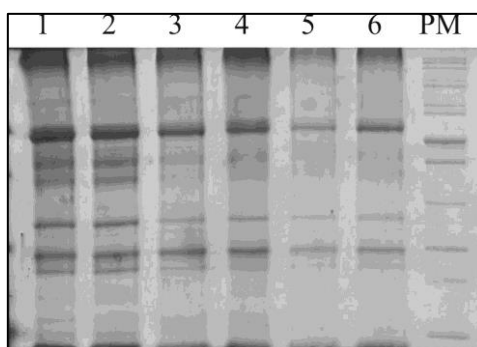
Niveles de expresión de genes que codifican enzimas involucradas en la síntesis de almidón (a y b) y degradación (c) mediante qPCR (Real Time). Los resultados son informados mediante la técnica del  $\Delta C_t$  en función al control interno  $\beta$ -ACT. Promedio de 4 repeticiones. d) Actividad almidón sintasa determinada en extractos de hojas. (a) o (b) fueron usados para aislar el grupo o los grupos que difieren de los otros, por medio de un test de comparaciones múltiples.

del almidón proveniente de las líneas transgénicas, determinamos el contenido de RS observando un pequeño pero significativo incremento del mismo en estas líneas (18.0% para E8-SBD123.1 y E8.SBD123.2) relativo a Col-0 (13.5%).

### **Respuesta transcripcional los genes asociados al metabolismo de almidón en *A. thaliana* E8-SBD123 y actividad almidón sintasa total**

Se llevaron a cabo estudios de expresión cuantitativa (PCR en tiempo real) de genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo de almidón en hojas de plantas cosechadas 4 horas después del comienzo de la fase lumínica (12 h) (ver sección 6-22 de materiales y métodos) utilizando al gen  $\beta$ -ACT (AT3G18780) como control interno. Las concentraciones relativas obtenidas fueron calculadas mediante la diferencia en el Ct del gen blanco y el control interno ( $\Delta$ Ct). Para evaluar si existen diferencias significativas en la expresión de cada gen en plantas silvestres y transgénicas, se realizaron comparaciones de dos muestras mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney, utilizando una probabilidad de error de tipo I de 0,05.

Para los genes que codifican a las almidón sintasas (Figura II-4a) observamos una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en la expresión de *GBSSI* y *SSII*, mientras que no observamos variaciones entre *SSI* y *SSIII* correspondientes a la comparación entre líneas transgénicas y control. Por otro lado, la *SSIV* sufre una significativa disminución de 0.35 veces en comparación con la línea de referencia Col-0. Además, tampoco detectamos alteraciones en los niveles de los transcritos de las subunidades mayor y menor de la ADP-glucosa pirofosforilasa (*ApSI* and *ApLI*) (Zeeman, y



**Figura II-5 SDS-PAGE de extractos proteicos totales de hojas de *A. thaliana*.**

Los extractos fueron obtenidos según se describe en la sección 6-12 de materiales y métodos. Las calles 1 y 4 pertenecen a dos extractos de las plantas silvestres Col-0, las calles 2 y 5 pertenecen a extracciones de la línea E8-SBD123.1, mientras que las calles 3 y 6 pertenecen a extracciones de la línea E8-SBD123.2. La calle identificada con PM pertenece al marcador de peso molecular PageRuler™ de Thermo Fisher scientific®.

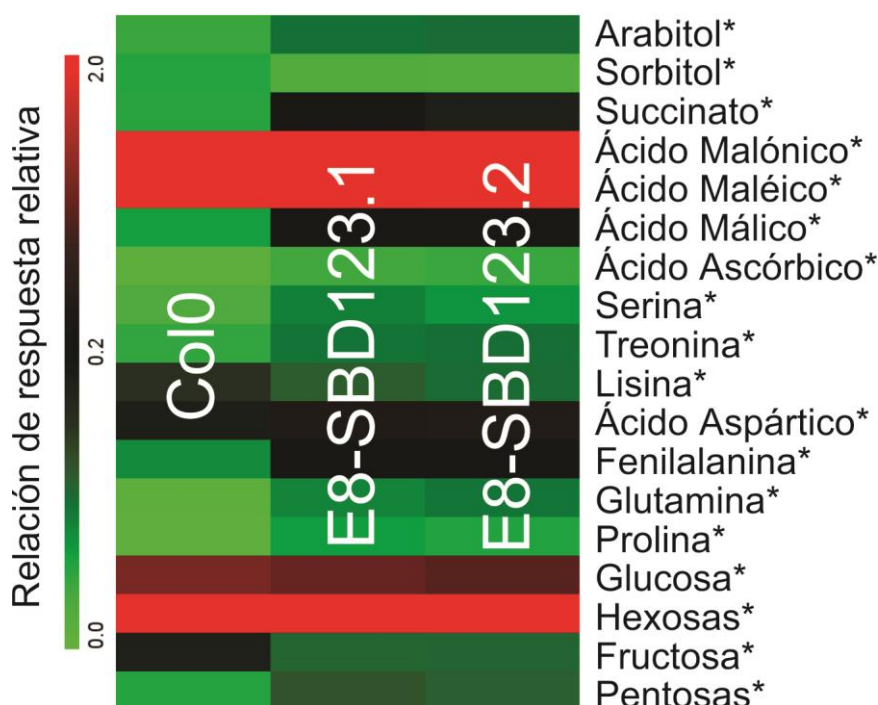
col., 2007). Sin embargo observamos una reducción en la expresión de genes involucrados en la regulación de la estructura del gránulo (*SBE1*, *DBE1* y *ATLDA*) (Figura II-4b).

Paralelamente, la actividad almidón sintasa total fue evaluada en un extracto de hojas (cosechadas a las 12 h de luz) utilizando un método espectrofotométrico modificado (Wayllace, y col., 2012). En la Figura II-4d, observamos una disminución significativa en la actividad sintasa total (entre 0.75 veces in E8-SBD123.1 y 0.81 veces en E8-SBD123.2) en comparación con Col-0. Vale la pena recalcar que los extractos crudos de las hojas control y transgénicas analizados por SDS-PAGE no mostraron cambios llamativos en los patrones proteicos y en el contenido total de proteína (Figura II-5).

Por último, evaluamos los niveles de los transcritos de genes involucrados en la degradación del almidón. Este proceso puede ser dividido en dos fases distintas: **iniciación**, mediada por las quinasas GWD y PWD, las cuales fosforilarán los residuos glucosídicos expuestos de la estructura cristalina del gránulo y **digestión**, llevada a cabo por amilasas (plastídica AMY2 y citosólica AMY2) y  $\alpha$ -1,4-glucanotransferasas (DPE1) (Orzechowski, 2008). En la Figura II-4c se muestra una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en los transcritos de *PWD*, *SEX4*, *DPE2*, *PHS2*, *AMY3* y *AMY2*, pero no en la expresión de *DPE1*, *GWD*, y *LSF1*. Esto sugiere que los genes involucrados en ambas fases están afectados, en concordancia con la alteración en la estructura y composición de los gránulos.

### Perfil de metabolitos de hojas

Con el objetivo de evaluar posibles modificaciones en el metabolismo global de las plantas transgénicas, decidimos analizar mediante GC-MS el perfil de metabolitos primarios en las hojas de plantas Col-0 y E8-SBD123. Este ensayo, fue llevado a cabo en plantas cosechadas a las 12 h de un ciclo de luz/oscuridad de 16h/8h. En la Figura II-6, observamos solo los metabolitos cuyo contenido fue significativamente alterado en la comparación de ambos tipos de líneas. De esta manera, el contenido de Lisina fue menor en las líneas transgénicas, en comparación con las plantas control (0.8 veces para E8.SBD123.1 y 0.7 veces para E8-SBD123.2). Por otro lado, el contenido de otros 6 aminoácidos se ha encontrado elevado en estas plantas: serina (3.0 veces para E8.SBD123.1 y 2.4 veces para E8-SBD123.2), treonina (2.0 veces para E8.SBD123.1 y 2.1 veces para E8-SBD123.2), ácido aspártico (2.6 veces para E8.SBD123.1 y 2.8 veces para E8-SBD123.2), fenilalanina (2.7 veces para E8.SBD123.1 y E8-SBD123.2), glutamina (7.7 veces para E8.SBD123.1 y 8.7 veces para E8-SBD123.2), y prolina (7.5 veces para E8.SBD123.1 y 6.6 veces para E8-SBD123.2). Además, se encontró una



**Figura II-6 Perfil metabólico de un extracto total de hojas de *A. thaliana*.**

Por razones de simplicidad, solo se muestran los metabolitos en los cuales se han encontrado diferencias significativas (\*) entre las líneas Col-0 y transgénicas (ANOVA 1 factor, 3 niveles). Los colores simbolizan la relación de respuesta relativa (del inglés “relative response ratio”), en donde el rojo representa los valores de este parámetro similares y mayores a 2.0, el color negro representa valores cercanos a 0.2, mientras que el color verde representa valores cercanos a 0.0. Este gráfico fue confeccionado con el programa TM4:MeV (Saeed, y col., 2003).

disminución en el contenido total de glucosa (0.9 veces para E8.SBD123.1 y 0.8 veces para E8-SBD123.2) y fructosa (0.6 veces para E8.SBD123.1 y E8-SBD123.2) en las plantas transgénicas. En las condiciones experimentales utilizadas, un grupo de hexosas y pentosas no fueron posibles de resolver; sin embargo, se observó una alteración significativa en el nivel de los mismos. En el caso de las hexosas, se encontró una disminución de 0.6 veces tanto para E8-SBD123.1 como para E8-SBD123.2 y para las pentosas, se encontró un aumento de 2.2 veces para E8-SBD123.1 y de 2.1 para E8-SBD123.2.

Varios intermediarios de la vía del carbono se encuentran alterados en las líneas E8-SBD123 en comparación con Col-0. En primer lugar, el ácido malónico se encuentra significativamente disminuido (0.7 veces para E8.SBD123.1 y 0.8 veces para E8-SBD123.2). El ácido malónico puede ser convertido a malonil-CoA a través de la enzima malonil-CoA sintetasa, y puede utilizarse como un precursor para la síntesis de ácidos grasos, como también de varios



aminoácidos y metabolitos secundarios (como flavonoides) (Chen, y col., 2011). Dos importantes intermediarios del ciclo TCA se encuentran aumentados en las líneas transgénicas, succinato 3.8 veces para E8.SBD123.1 y 3.4 veces para E8-SBD123.2, y el malato aumentado 4.5 veces para E8.SBD123.1 y 4.9 veces para E8-SBD123.2. Además, el ácido maléico que puede metabolizarse a fumarato (otro intermediario del ciclo TCA) se encuentra disminuido significativamente (0.7 veces para E8.SBD123.1 y 0.5 veces para E8-SBD123.2). Como se muestra en la Figura II-6, existe un incremento en el contenido de ascorbato de unas 3.9 veces en la línea E8-SBD123.1 y de 4.4 veces en la línea E8-SBD123.2 en comparación con Col-0. Los azúcares-alcohol incluyen formas cíclicas, como el mio-inositol, y moléculas lineales como el sorbitol (o glucitol). Se observó también una disminución en el contenido de sorbitol de 0.4 veces para en ambas líneas transgénicas, y una un aumento en el contenido de arabitol de 2.3 veces para E8.SBD123.1 y 2.4 veces para E8-SBD123.2.

Finalmente, hemos decidido evaluar el contenido de sacarosa total utilizando técnicas bioquímicas. De esta forma, observamos que el contenido de este metabolito en función del peso fresco ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ), es de  $990.8 \pm 65.9$  en la línea Col-0,  $1376.7 \pm 65.8$  en E8.SBD123.1, y de  $1722.3 \pm 90.4$  en E8-SBD123.2, evidenciando que la sacarosa es significativamente más abundante ( $p < 0.001$ ) en las líneas transgénicas.

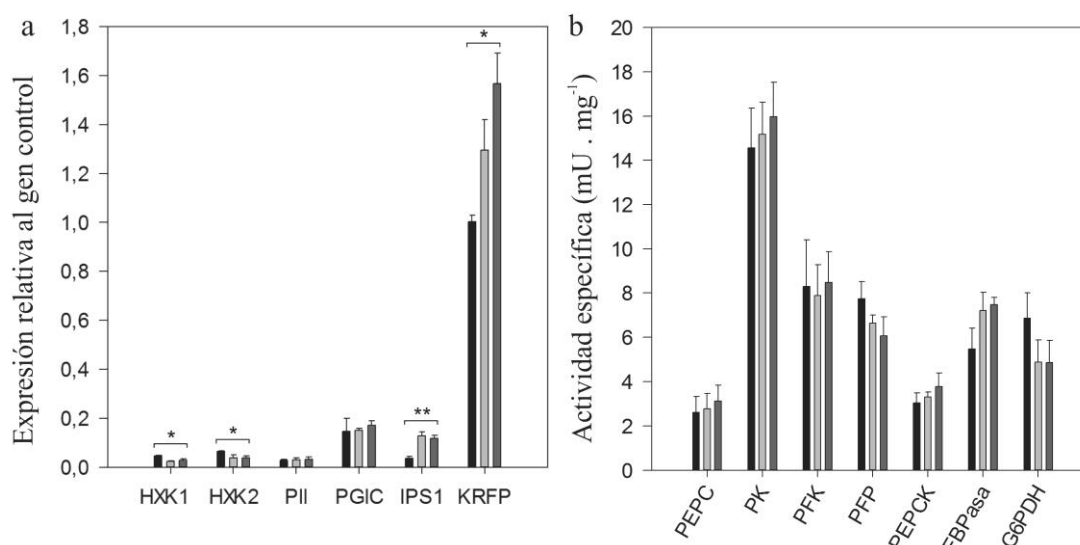
### **El metabolismo central del carbono no aparenta influir en la partición de carbono entre los distintos polisacáridos de las plantas transgénicas.**

Con el propósito de analizar un vínculo potencial entre los polisacáridos de reserva y estructurales de pared, evaluamos los cambios en el metabolismo del carbono, en un principio a nivel transcripcional y finalmente, a nivel enzimático.

### **Respuesta transcripcional de los genes asociados al metabolismo de carbono en *A. thaliana* y su correlato en actividades enzimáticas**

El metabolismo del carbono, usualmente está visto como el eje central entre vías laterales, como el metabolismo del almidón y de la sacarosa, orientando la distribución del carbono (Sulpice, y col., 2010). Varias proteínas se encuentran involucradas en la unión de ambas vías. En la Figura II-7a se muestran los niveles de expresión de algunos genes que codifican proteínas involucradas en este proceso.

Puede observarse que no existe una diferencia apreciable en la expresión del gen que codifica la fosfogluco isomerasa C (*PGIC*, AT5G42740) entre las plantas E8-SBD123 y Col-0. No se detecta diferencia en la expresión del gen *PII* (AT5G39790). Este gen codifica un coordinador



**Figura II-7 Niveles de expresión de genes que codifican enzimas involucradas en el metabolismo de carbono.**

Los niveles de los transcripts fueron determinado mediante qPCR (Real Time) en hojas de líneas silvestres y transgénicas. Los resultados son informados mediante la técnica del  $\Delta C_t$  en función al control interno  $\beta$ -ACT. Promedio de 5 repeticiones. Las diferencias significativas se muestran con (\*) cuando  $p < 0.05$ , o (\*\*) cuando  $p < 0.01$ .

global del metabolismo de carbono y nitrógeno (Mizuno, y col., 2007). Por otro lado, se comprobó un descenso significativo en la expresión de HXK1(AT4G29130) (0.5 veces para E8.SBD123.1 y 0.6 veces para E8-SBD123.2) y de HXK2 (AT2G19860) (0.6 veces para ambas líneas transgénicas). HXK1 es el regulador del metabolismo de carbono más estudiado y es sabido que determina los niveles de glucosa y la actividad de otras vías como la síntesis de almidón. HXK1 Y HXK2 comparten un 85% de identidad, y poseen funciones catalíticas similares. Además poseen un péptido tránsito de ubicación mitocondrial (Karve y Moore, 2009). Se ha probado que HXK1 se encuentra unida a membranas en mitocondrias, vacuolas y en el núcleo en niveles apreciables (Karve, y col., 2008; Cho, y col., 2009), mientras que HXK2 solo se encuentra asociado a mitocondria (Karve, y col., 2008). Debido a que su actividad regulatorias se encuentra desacoplada de su actividad catalítica se dice que posee actividad “moonlighting” (Karve, y col., 2008; Cho, y col., 2009). Como consecuencia, la disminución en la expresión de HXK1 y HXK2 puede tener un gran impacto en las vías metabólicas relacionadas (para almidón y sacarosa). En la Figura 12b se muestran los ensayos de actividades enzimáticas determinadas para enzimas asociadas a la vía central del carbono. Como puede observarse, no

existen diferencias en ninguna de las enzimas ensayadas, sugiriendo que esta vía no es responsable de la alteración en el contenido de almidón.

Con el objeto de encontrar un transcripto biomarcador potencial para predecir biomasa (PF) en varias líneas de *Arabidopsis*, Sulpice y colaboradores encontraron dos genes candidatos cuya expresión es regulada por la vía del carbono. La expresión del primero de ellos se correlaciona negativamente con la variable “masa de la roseta” (*IPS1* / At4g39800), mientras que el segundo de ellos lo hace positivamente (*KRFP* / At1g23390) (Sulpice, y col., 2009; Oh, y col., 2011). *IPS1* codifica para la mio-inositol 3 fosfato sintasa 1, enzima que cataliza la conversión de la D-glucosa-6-fosfato, en 1L-mio-inositol-1-fosfato, el primer paso en la producción de todos los compuestos que contienen inositol, incluyendo fosfolípidos. Por otro lado, *KRFP* codifica para una proteína denominada “Kelch repeat-containing F-box family protein” la cual no ha sido bioquímicamente caracterizada. Las anotaciones GO de este gen solo informan sobre una posible localización nuclear. De esta forma, debido a que las líneas transgénicas evaluadas presentan un incremento en su biomasa (ver capítulo 1), hemos decidido evaluar la expresión de estos genes en comparación con Col-0. Así, hemos observado que el transcripto de *KRFP* se encontró significativamente aumentado 3.5 veces y 3.2 veces en las líneas E8-SBD123.1 y E8-SBD123.2, respectivamente. Al contrario a lo reportado por Sulpice, observamos que el transcripto de *IPS1* se encontró elevado en ambas líneas transgénicas comparadas con Col-0 (1.3 veces para E8.SBD123.1 y 1.6 veces para E8-SBD123.2).

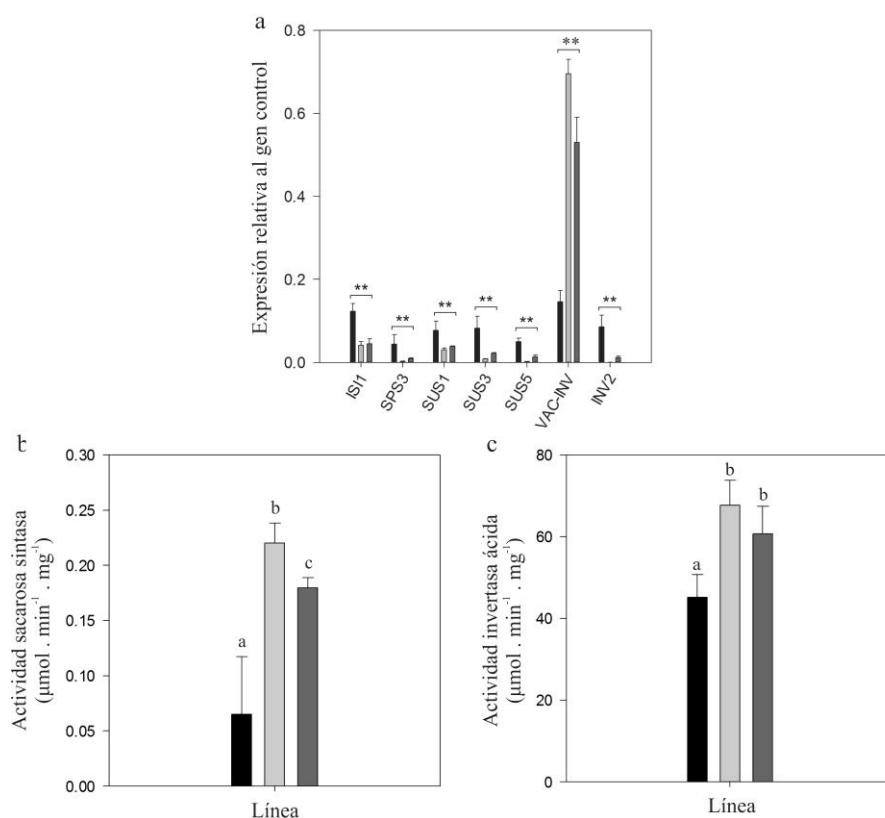
A fin de evaluar si la disminución en el contenido de hexosas en las hojas de las líneas transgénicas se debe a cambios en la actividad de las enzimas glucolíticas hemos determinado las actividades de las principales enzimas de esta vía. Este análisis enzimático no encontró cambios significativos en el flujo glucolítico, debido a que enzimas como la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), piruvato quinasa (PK), fosfofructoquinasa (PFK) y la fosfofructoquinasa dependiente de pirofosfato inorgánico (PPi) (Plaxton, 1996) mostraron niveles de actividad similar, tanto en hojas transgénicas como control (Figura II-7b).

### **El metabolismo de la sacarosa juega un rol crítico en la partición de carbono de las líneas transgénicas.**

La partición del carbono celular fue estudiada en distintos trabajos (Haigler, y col., 2001; McKinley, y col., 2016), encontrando que la ultra-estructura de la pared celular puede afectar este proceso. En estos estudios, el metabolismo de la sacarosa juega un rol fundamental proveyendo sustratos para la síntesis de polímeros de reserva y estructurales. Por esta razón, procedimos a evaluar esta vía metabólica.

En los últimos años, se ha postulado al metabolismo de la sacarosa como el principal regulador entre el metabolismo de la glucosa y el de polímeros de reserva. Existen dos vías principales de degradación de la sacarosa *in vivo*, que involucran distintas actividades enzimáticas: la sacarosa sintasa (SuSy) y la invertasa (INV) (Koch, K. 2004), las cuales difieren en sus productos y en su rol fisiológico.

En la Figura II-8a, se muestra una disminución significativa en la expresión génica de ambas vías. El transcripto del gen de la invertasa de la pared celular (*INV2*) (AT3G52600.1) se encontró muy disminuido en ambas líneas transgénicas en comparación con Col. Además, la



**Figura II-8 Caracterización se la síntesis y degradación de sacarosa.**

Las medidas fueron determinadas en hojas de líneas Col-0 (negro), E8-SBD123.1 (gris claro) y E8-SBD123.2 (gris oscuro). a) Niveles de expresión de genes involucrados en el metabolismo global (*ISI1*) y en la síntesis (*SPS3*), y en la degradación (*SUS1*, *SUS3*, *SUS5*, *VAC-INV* y *INV2*) de sacarosa mediante qPCR (Real Time) en las líneas silvestre (negro), E8-SBD123.1 (gris claro) y E8-SBD123.2 (gris oscuro) en hoja. Los resultados son informados mediante la técnica del  $\Delta\text{Ct}$  en función al control interno  $\beta\text{-ACT}$ . Promedio de 4 repeticiones. b) Actividad SuSy y c) actividad Invertasa ácida en extractos de hojas de las tres líneas Col-0, E8-SBD123.1 y E8-SBD123.2. (a) o (b) fueron usados para aislar el grupo o los grupos que difieren de los otros, por medio de un test de comparaciones múltiples.

expresión de los genes que codifican las distintas isoformas de la sacarosa sintasa (*SUS1*, *SUS3*, *SUS5*) (AT5G20830.1, AT4G02280 y AT5G37180, respectivamente) se encuentra significativamente disminuida en ambas líneas en comparación con Col-0. Sin embargo, existe un llamativo aumento en la expresión del gen de la invertasa ácida vacuolar (*VAC-INV*) (AT1G12240).

La proteína ISII (“Impaired Sucrose Induction 1”) se expresa principalmente en el floema de las hojas de *A. thaliana* y se encuentra involucrada en la disposición del carbono y en el desarrollo de la hoja (Rook, F. et al. 2006). Se ha demostrado que la presencia de ISII es requerida para la expresión de los genes involucrados en el metabolismo de almidón, como *BAM* ( $\beta$ -amilasa AT4G15210), a altos niveles intracelulares de glucosa y sacarosa (Rook, F. et al. 2006). En la Figura II-10a, se muestra que la expresión de *ISII* (AT4G27750) se encuentra disminuida 0.33 veces tanto en E8-SBD123.1 como en E8-SBD123.2.

Finalmente, la enzima sacarosa fosfato sintasa juega un rol clave en la síntesis de sacarosa. En la Figura II-8a también se muestra que los transcriptos del gen *SPS3* (AT1G04920) se vuelven débilmente detectables en ambas líneas transgénicas.

### Actividad enzimática de enzimas asociadas al metabolismo de la sacarosa

Las invertasas extracelulares y vacuolares acoplan el transporte de la sacarosa al apoplasto y la vacuola, con el transporte de hexosas a través del plasmalema y el tonoplasto, respectivamente (Nguyen-Quoc, 2001; Koch, 2004). Por esta razón, un incremento en la actividad de las invertasas ácidas puede actuar como fuerza motriz para la expansión celular, previamente reportada en las hojas transgénicas (ver capítulo 1).

Paralelamente, la sacarosa sintasa (SuSy), es una enzima citosólica involucrada en la continua y rápida degradación de sacarosa en el citosol, así como también en su síntesis (Nguyen-Quoc, 2001; Koch, 2004). Además, SuSy puede localizarse en patrones consistentes con la deposición de celulosa y calosa, contribuyendo con la síntesis de polisacáridos de la pared celular (Amor, y col., 1995; Pozueta-Romero, y col., 2004).

Teniendo en cuenta esto, procedimos a la evaluación de la actividad sacarosa sintasa (Figura II-8b) e invertasa ácida (AI) (Figura II-8c) observando un importante incremento de las mismas en las plantas transgénicas. De esta forma, la alteración en la composición de la pared celular, y el incremento en la biomasa observado en las plantas transgénicas puede relacionarse con un incremento en la demanda de azúcares en el apoplasto y, en consecuencia, un incremento en la

Parámetro	Col-0	SD	E8-SBD123.1	SD	E8-SBD123.2	SD	P < 0.05
Tasa de intercambio de CO <sub>2</sub> (μmol s <sup>-1</sup> m <sup>-2</sup> )	4.14	0.91	3.73	0.71	4.10	0.77	No
Clorofila A (mg g <sup>-1</sup> PF)	1.28(a)	0.09	1.09(b)	0.06	1.08(b)	0.01	Sí**
Clorofila B(mg g <sup>-1</sup> PS)	0.43(a)	0.03	0.36(b)	0.025	0.37(b)	0.04	Sí**
Clorofila A/B	2.97	-	3.08	-	3.01	-	No†

**Tabla II-1 Parámetros fotosintéticos en hojas de *A. thaliana*.**

Estos parámetros fueron evaluados en hojas de plantas de 28 días. (\*\*) P<0.01. (†) ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wallis)

actividad de la SuSy. Por otro lado, un aumento en el crecimiento por expansión, puede explicarse por un aumento en la actividad enzimática de las AI.

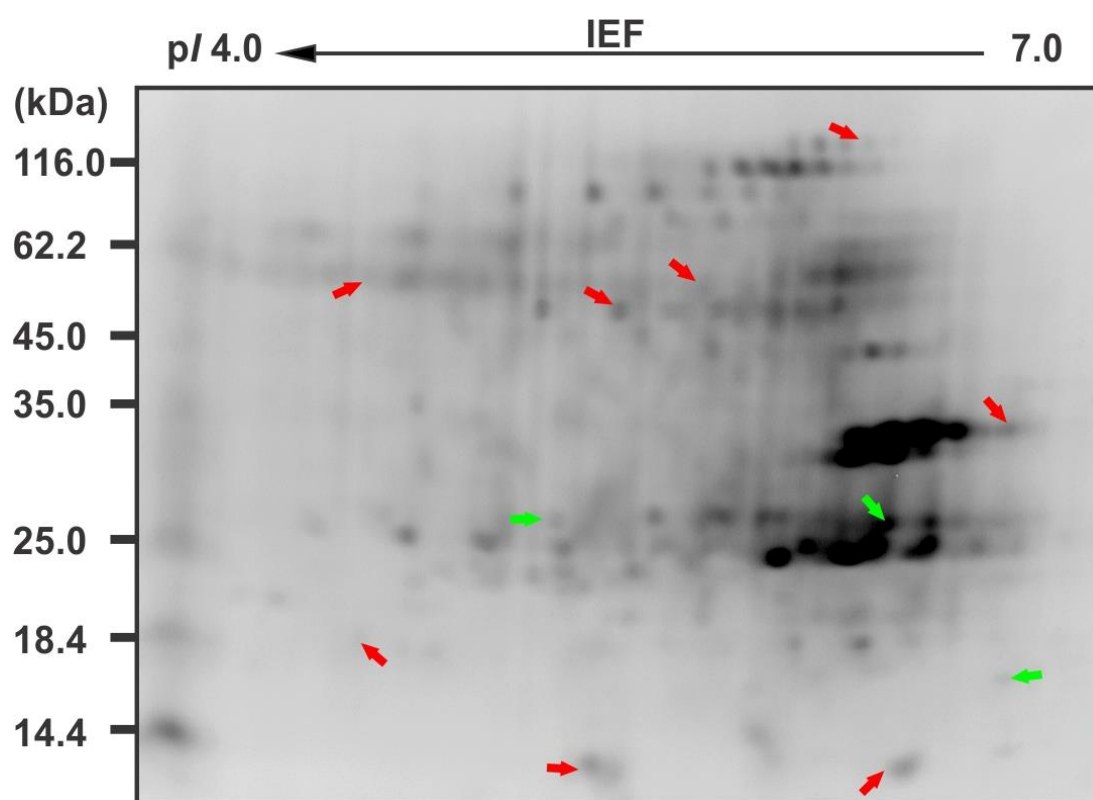
### Contenido de clorofila y tasa de intercambio de CO<sub>2</sub> en las líneas E8-SBD123

Estudios pioneros (Madsen, 1968) reportaron que el contenido de almidón, glucosa y sacarosa en plantas de tomate, así como también el peso fresco y el ancho de limbo foliar, puede ser afectado por un incremento en la concentración del CO<sub>2</sub> atmosférico. Por otro lado, se conoce que el almidón transitorio de la hoja es importante no solo como reserva para soportar el crecimiento heterotrófico en la oscuridad, sino también como producto final esencial para la utilización de triosas fosfato. Como resultado indirecto de esto, se produce el reciclado de fosfato inorgánico (Pi) para la síntesis de ATP y, de esta forma, minimizar la regulación negativa de la fotosíntesis (Gibson, y col., 2011). Un análisis en la tasa de intercambio de CO<sub>2</sub> puede determinar si el incremento en la expansión celular en plantas maduras puede deberse a un incremento en la fijación de carbono. Nosotros hemos evaluado este parámetro no encontrando diferencias significativas entre las líneas transgénicas y control (Tabla II-1). Sin embargo, es importante aclarar que el incremento en la biomasa se puede explicar con un incremento en la fijación neta de CO<sub>2</sub> debido al incremento en la superficie fotosintética. El contenido de clorofila total y específico (Clorofila A y B) por peso seco se encontró disminuido un 15% en las líneas E8-SBD123 en comparación con Col-0, sin embargo, no se observó diferencias en la relación de clorofilas A/B (Tabla II-1).

### Análisis a nivel proteoma por técnicas de electroforesis de proteínas en dos dimensiones (DIGE)

Para el estudio de proteómica se realizaron geles bidimensionales (2D) siguiendo la técnica DIGE. Para ello, las muestras a comparar (Hoja Col-0 y Hoja E8-SBD123) fueron marcadas con fluoróforos diferentes (Alexa 532 o Alexa 594) y separadas electroforéticamente en dos

dimensiones en los mismos geles. La primera dimensión de los geles consistió en un isoelectroenfoque en un gradiente de pH de 4 a 7, y la segunda dimensión consistió en un SDS-PAGE al 12,5% (p/v) de acrilamida. De esta manera, se estudió la expresión diferencial de proteínas entre los pares anteriormente descritos. Las imágenes (Figura II-9) obtenidas fueron analizadas con el programa Image Master 2D-Platinum para identificar los puntos proteicos de expresión diferencial. Este procedimiento se repitió cuatro veces utilizando extracciones proteicas diferentes para cada tipo de muestra. Los geles 2D fueron altamente reproducibles para cada muestra y los puntos identificados presentaron una resolución aceptable. En estos análisis se encontraron 11 puntos proteicos con expresión diferencial de los cuales sólo fueron identificados correctamente 3 por MALDI-TOF: una di-oxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato involucrada en la síntesis de Alquenil Glucosinolatos (AT4G03060); Fibrilina (FIB)



**Figura II-9 Electroforesis en 2-D gel de extracto de proteínas totales de hojas de *A. thaliana*.**

Las flechas resaltan los puntos que sufrieron alteraciones significativas entre plantas transgénicas E8-SBD123 y Col-0. Las flechas rojas indican los puntos que no han podido ser identificados mediante MALDI-TOF-MS, mientras que las flechas verdes indican los puntos que han sido identificados (ver texto). El rango de pH utilizado para el IEF es indicado por los números en la parte superior del gel (4,7). Los números del lado izquierdo indican el tamaño de los marcadores moleculares en kDa.

involucrada en fotoinhibición y es regulada por ácido abscísico (AT4G04020); GAPC-2, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (AT1G13440) involucrada en distintos procesos como respuesta a estrés oxidativo, respuesta a iones cadmio, gluconeogénesis, glucólisis y respuesta a estrés bióticos, entre otros. Los problemas observados para identificar los puntos proteicos se debieron principalmente a la gran contaminación por proteínas mayoritarias como ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa, y enzimas pertenecientes a los fotosistemas.

### Discusión:

En este capítulo se prosiguió con el análisis del fenotipo de las plantas E8-SBD123 centrándonos en las vías metabólicas centrales y en el metabolismo del almidón y la sacarosa. Estas plantas presentan una disminución en el contenido de almidón total al final del período de oscuridad y el principio del período luminoso y un incremento en el contenido de amilosa (y almidón resistente). Es llamativo cómo una alteración en las propiedades de la pared celular puede afectar las características del almidón. Además, observamos una modificación en la distribución del tamaño de los gránulos.

Se conoce que las hojas de *Arabidopsis thaliana* se expanden de manera periódica mostrando un pico de crecimiento por expansión al principio del período de luminoso (Wiese, y col., 2007) y esto correlaciona con el período donde ocurre la máxima deposición de carbono en la pared celular. El flujo de carbono hacia el almidón aumenta durante el período de luz del 14% al comienzo del día a más del 30% más tarde, lo que significa que las plantas una vez que han adquirido una cantidad suficiente de luz, activan la síntesis de almidón (Kolling, y col., 2015). Esto concuerda con nuestros resultados, en los cuales las plantas transgénicas sufren una disminución en el contenido de almidón al principio del día, pero se compensa al final del mismo.

En la regulación del metabolismo del almidón, las modificaciones post-traduccionales de las proteínas proveen el mayor impacto en el control de las actividades enzimáticas, aunque los genes que codifican estas enzimas también sufren regulación a nivel transcripcional. Por ejemplo, la expresión del gen *GBSSI* está controlada por dos factores de transcripción circadianos (Ingkasuwan, y col., 2012). Se sabe que la *GBSSI* se encuentra involucrada en la polimerización de la amilosa, mientras que el resto de las almidón sintasas se encargan de la síntesis de amilopectina (Zeeman, y col., 2007). De esta forma, vale la pena resaltar que la alteración en los niveles del transcripto de *GBSSI* puede verse reflejado en el aumento de la fracción amilosa del almidón que cuantificamos. Además, *SSII* sufren una disminución en el



nivel de sus transcritos que puede correlacionarse con la disminución en la actividad almidón sintasa total observada en plantas cosechadas a principios del día (12h). Esto concuerda con la noción que la isoforma que más contribuye a la actividad almidón sintasa soluble, es la SSII (Streb, y col., 2009; Streb y Zeeman, 2012). Por otro lado, previamente se ha reportado que mutantes en *SSII* y *BE* en trigo presentan un aumento en el contenido de amilosa (Yamamori y Quynh, 2000; Botticella, y col., 2011). La expresión de ambos genes se encuentra disminuida en las plantas transgénicas evaluadas, hecho que podría dar sustento, al menos parcialmente, al aumento de amilosa observado.

Otra explicación puede deberse a que la canalización de carbono puede afectar más profundamente la fracción amilopectina ya que la misma es más fácilmente accesible a enzimas degradativas en los períodos de oscuridad. Nuestro trabajo sugiere que el metabolismo de la pared celular y el de almidón se encuentran acoplados. Esto se encuentra fundamentado también por varios estudios en los que se muestra que la partición del carbono puede verse afectado por la modificación en la síntesis de componentes de la pared celular (Haigler, y col., 2001; McKinley, y col., 2016). De esta forma, sugerimos que estas plantas pueden ser utilizadas como un modelo para describir la partición de carbono.

Dado que el almidón se acumula durante el período de luz y posteriormente es utilizado para mantener el crecimiento en los períodos de oscuridad, se ha propuesto que los niveles de almidón pueden ser utilizados para predecir la generación biomasa de una planta. Es más, el almidón es capaz de condensar el estado metabólico de la planta balanceando la disponibilidad de recursos y reflejando la eficiencia con la cual el carbono se encuentra direccionado a la producción de biomasa (Sulpice, y col., 2009; Sulpice, y col., 2010). El almidón se correlaciona fuerte y negativamente con la biomasa de la roseta, indicando que las líneas de *Arabidopsis* que producen gran biomasa son capaces de utilizar el carbono más eficientemente para el crecimiento. Por otro lado, cuando Col-0 fue crecido en diferentes fotoperiodos la tasa de degradación de almidón puede explicar casi la totalidad de la variación relativa a la tasa de crecimiento ( $R > 0.99$ ) (Sulpice, y col., 2010). Todo esto concuerda con el contenido de almidón y biomasa encontrada en las líneas Col-0 y E8-SBD123.

A pesar de que los mecanismos de regulación involucrados en la degradación de almidón no se encuentran totalmente resueltos, se conoce que existe una débil correlación entre la expresión génica y la actividad enzimática (Smith, S. M. et al. 2004). Así, se plantea que la mayor parte de la regulación de esta vía está dada por modificaciones post-traduccionales, concentración de metabolitos o fosforilación reversible (Mikkelsen, R. et al. 2005). En este contexto, la fosfatasa

de especificidad dual *SEX4* (AT3G52180.1) es capaz de remover los grupos fosfato de proteínas y carbohidratos tales como el glucógeno y la amilopectina (Kerk, D. et al. 2006). Se ha establecido que mutantes de inactivación génica (“knock-out”), y mutantes con disminución en la expresión génica (“knock-down”) de *SEX4* presentan un fenotipo de exceso de almidón (“starch excess”) (Kerk, D. et al. 2006). Al mismo tiempo, el transporte de maltosa (el producto de degradación del almidón) al interior celular y su posterior conversión a un pool de hexosa-fosfato a través de *DPE2* y *PHS2* (Orzechowsky, S. 2008), también es importante en la degradación del almidón. De esta forma, encontramos que los genes que codifican a los efectores principales en la regulación de la degradación del almidón (*SEX4*, *DPE2*, *PHS2* y *PWD*) (Orzechowsky, S. 2008) presentan una menor expresión en las líneas transgénicas, aunque no podemos afirmar que estas variaciones afecten directamente la regulación de esta vía metabólica.

La invertasa es una enzima que hidroliza la sacarosa irreversiblemente en glucosa y fructosa, contribuyendo a los primeros pasos del desarrollo (Koch, 2004). Las isoformas de la invertasas con diferentes propiedades bioquímicas se acumulan en diversos compartimientos celulares cumpliendo roles específicos: la isoforma citosólica (invertasa neutra o alcalina), la isoforma vacuolar, y la isoforma extracelular (invertasa de pared celular). El clivaje de la sacarosa por la invertasa vacuolar ácida (*VAC-INV*) generalmente correlaciona con crecimiento y expansión celular (Ricardo y Ap Rees, 1970) generando la presión de turgor necesaria para dicha expansión. La hidrólisis de la celulosa por la invertasa de pared genera el potencial osmótico esencial para descargar el contenido del floema a los órganos sumidero. Por último, la invertasa neutral (*INV2*) está involucrada en el balance de hexosas en el citoplasma (Sturm y Tang, 1999). Por otro lado, las sacarosa sintasas son glucosiltransferasas involucradas en convertir sacarosa en la presencia de UDP a UDP-glucosa y UDP-fructosa. Si bien la SuSy es capaz de sintetizar sacarosa bajo condiciones apropiadas *in vitro*, existe evidencia que sugiere que *in vivo* se encuentra primariamente involucrada en la hidrólisis de la misma. En general, el clivaje de la sacarosa se encuentra asociado a otros procesos anabólicos en los cuales la UDP-glucosa se utiliza como precursor (celulosa, calosa y almidón) (Albrecht y Mustroph, 2003; Koch, 2004). En *Triticum spp*, homólogos a las SuSy de *A. thaliana* se localizan en regiones de alta deposición de calosa y celulosa (Albrecht y Mustroph, 2003). Además, la isoforma de SuSy se encuentra en el citoplasma de forma soluble, o asociada a los complejos CESA y al cito-esqueleto de actina según su estado de fosforilación (Amor, y col., 1995). De esta manera, se produce la canalización de las unidades de UDP-Glc directamente a la síntesis de celulosa. Por otro lado, se ha demostrado experimentalmente que esta canalización puede estar directamente

involucrada en la síntesis de almidón cloroplástica (Koch, 2004). Por esto, los análisis de expresión de *INV-VAC* e *INV2* podrían sugerir una disminución en el contenido del pool de hexosas, mientras que una disminución en la expresión de *SUS 1, 3 y 5* sugiere una reducción en la cantidad de sustratos requeridos para la biosíntesis de polisacáridos funcionales.

Se ha propuesto que los metabolitos correlacionan débilmente con la biomasa, atentando contra el uso de los mismos como biomarcadores (Sulpice, y col., 2010). Sin embargo, estos pueden ser usados para tratar de describir el flujo metabólico el cual puede terminar en un uso de carbono diferencial o en la contribución de un proceso metabólico de interés. Por ejemplo, el ciclo TCA es una vía central que se ve afectada por diversos procesos. Esta vía es esencial para proveer energía y precursores durante el crecimiento celular. Es por esto que una correlación significativa (pero débil) ha sido encontrada entre algunos de estos metabolitos (succinato) y la biomasa (Sulpice, y col., 2010). Por ello, estos metabolitos pueden ser esenciales para entender el incremento de biomasa en las líneas transgénicas. Por ejemplo, el malato se acumula en altos niveles en la vacuola de muchas plantas llevando a cabo funciones osmóticas y proveyendo un almacenamiento de carbono temporario (Sulpice, y col., 2010).

Por otra parte, el ascorbato afectaría la expansión celular tanto directa como indirectamente (Cordoba y Gonzalez-Reyes, 1994; Smirnoff y Wheeler, 2000). En primer lugar, puede actuar como dador de electrones del CYTb incrementando el transporte de electrones en raíces de cebolla (Hidalgo et al., 1989; Gonzales-Reyes, 1994, 1995) llevando a una disminución en el pH apoplástico o a la hiperpolarización del plasmalema. Ambos procesos fueron relacionados con la expansión celular (Cleland, 1971; Cosgrove, 1993). En segundo lugar, el ascorbato puede inhibir el efecto de mermado de peróxido de hidrógeno en el compartimiento apoplástico, disminuyendo el entrecruzamiento de los polímeros de pared. En tercer lugar, este metabolito se encuentra involucrado en la biosíntesis de proteínas ricas en hidroxiprolina (extensinas) requeridas para la estructuración de la pared celular y en la expansión de la misma (Cordoba y Gonzalez-Reyes, 1994; Smirnoff y Wheeler, 2000).

Por otro lado, se cree que *Arabidopsis* no acumula sorbitol, y que es rápidamente metabolizado a otros hidratos de carbono por la sorbitol deshidrogenasa dependiente de  $\text{NAD}^+$  (SDH, EC 1.1.1.14) y por la sorbitol oxidasa, produciendo fructosa y glucosa, respectivamente. Sin embargo, en otras especies, el sorbitol puede actuar como osmoprotector o como molécula de transporte de carbono asimilado (Aguayo, y col., 2013).

Finalmente, el contenido de varios aminoácidos se encontró modificado en las líneas transgénicas. Algunos de éstos pueden estar relacionados a procesos fisiológicos específicos como por ejemplo, se sugiere que la prolina puede actuar como osmolito reduciendo la dependencia de iones y además, protegiendo la estructura de macromoléculas en células estresadas (Chiang y Dandekar, 1995). De esta forma, la acumulación de prolina detectada podría contribuir a la fuerza de turgor necesaria para la expansión celular.

Por todo lo expuesto, es posible asumir que la relocalización del carbono explicaría las alteraciones observadas en el metabolismo del almidón. Es bien conocido que durante la fotosíntesis, el carbono se exporta al citosol y es convertido subsecuentemente a sacarosa o, en su defecto, es retenido en el cloroplasto y convertido en almidón. De esta manera, el balance almidón-sacarosa podría verse afectado en las líneas E8-SBD123 por el desvío del carbono fijado como sacarosa para la producción de los componentes de la pared celular que sustentan la expansión a expensas de una menor acumulación de almidón. Sin embargo, a medida que avanza el día, las plantas transgénicas serían capaces de llegar a reponer los valores normales del polisacárido de reserva una vez los requerimientos estructurales hayan sido cumplidos. A pesar de esto, no es posible asegurar que este fenotipo es un efecto compensatorio a la expresión de los SBD en la pared celular o si se debe a una respuesta que emula a la gatillada por proteínas de remodelación de la pared, tales como las expansinas. Es poco probable que el papel de estas proteínas se base solamente en la modificación fuerzas físicas que impulsan la expansión celular.

Por otro lado, no está claro si la sola expresión de los SBD en la pared es interpretada como daño o como una alteración en el sistema de crecimiento normal. Es posible que una señal localizada en la pared pueda estar involucrada en este efecto. Es razonable pensar que señales hormonales estén integrando la regulación de las vías metabólicas nombradas a través distintitos tejidos y de distintos órganos. De esta forma, existen sistemas de señales de estrés (ej. biótico) que pueden afectar directamente el crecimiento y el metabolismo celular. Un ejemplo de esto es el sistema asociado a mitocondrias TOR (Deprost, y col., 2007), o el receptor de pared celular THE1, cuya vía de señalización se superpone con la vía de los brasinoesteroides (Pilling y Hofte, 2003; Hematy, y col., 2007b; Guo, y col., 2009a; Guo, y col., 2009b). Este tipo de señales gatilla la expresión de diversos factores que pueden integrarlas a nivel de la pared con los procesos de distribución de carbono. Es más, es llamativo que la síntesis de brasinoesteroides se encuentre regulada de forma circadiana, específicamente al principio del día, en sincronía con los picos en la tasa de expansión de las hojas de *Arabidopsis thaliana* (Bancos, y col., 2006; Wiese, y col., 2007).

En este capítulo fue posible continuar la caracterización fenotípica de las plantas transgénicas, encontrando que el carbono en las plantas E8-SBD123 puede ser dirigido desde el metabolismo central y de la sacarosa, al metabolismo de la pared celular permitiendo el incremento en la biomasa. Sin embargo, es necesaria más evidencia para construir un modelo confiable que integre la expansión celular, las señales en la pared, y la distribución de carbono.

### III. CAPÍTULO 3:

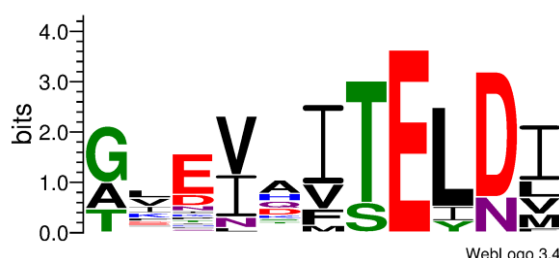
---

Estudio de los CBM N-terminales de la  
ATXYN1 de *Arabidopsis thaliana*

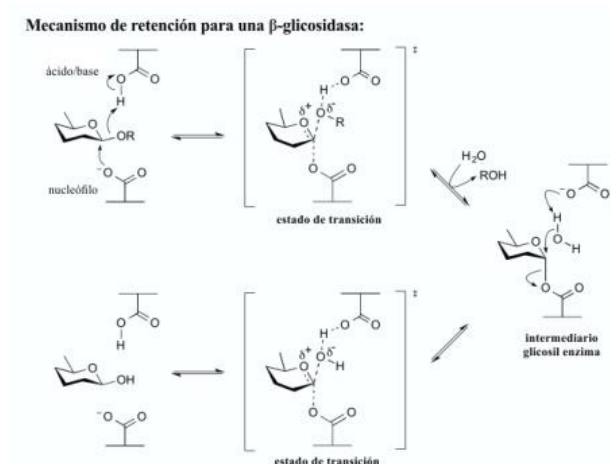
## Introducción:

El término hemicelulosa incluye una colección de polisacáridos no celulósicos que presentan una gran variación interespecie o, inclusive, dentro de una misma especie de plantas y sus tejidos. Las hemicelulosas más comunes incluyen al xilano, abundante en gramíneas y angiospermas, manano, abundante en gimnospermas, y xiloglucano, abundante en muchas angiospermas (Horn, y col., 2012). La estructura del xilano consta de un esqueleto lineal de D-xilopiranosas unidos por enlaces  $\beta$ -1,4, y varias ramificaciones. El xilano es degradado principalmente por enzimas glucosil hidrolasas con actividad endo- $\beta$ -1,4-xilanasas (xilanasas) (EC 3.2.1.8) y con actividad exo- $\beta$ -1,4-xilosidasa (xilosidasas) (EC 3.2.1.37). A la fecha, las glucosil hidrolasas se clasifican en 135 familias (Cantarel, y col., 2009a) de acuerdo con su similitud de secuencias. Sin embargo, los dominios GH de las xilanasas se clasifican únicamente en dos familias: familia 10 y familia 11 (Henrissat and Bairoch 1996). La estructura de los dominios GH10, corresponden a un barril  $\alpha/\beta$  (barril TIM), con un típico surco en el centro en donde se encuentra el sitio activo. El mismo se encuentra definido por una secuencia consenso [G/T/A]-X-X-[L/I/V/N]-X-[I/V/M/F]-[S/T]-E-[L/I/Y]-[D/N]-[L/I/V/M/F] en la que se encuentra un residuo de glutamato altamente conservado. (Figura III-1) (Suzuki, y col., 2002).

Por otro lado, las xilanasas se clasifican como enzimas de retención de la configuración estereoquímica de los sustratos (Lairson, y col., 2008). La reacción ocurre mediante una asistencia ácido/base y nucleofílica entre dos residuos de amino ácidos, glutamato (E) y aspartato (D), localizados a 5.5 Å de distancia entre ellos. En el primer paso (paso de glucosilación), un residuo juega un rol de nucleófilo atacando el centro anomérico, desplazando la aglicona y formando un intermediario enzima-glucósido (Figura III-2). Al mismo tiempo, el otro residuo funciona como un catalizador ácido protonando el oxígeno glucosídico mientras



**Figura III-1 Esquema de la secuencia consenso del sitio activo de las GH10.**  
Ilustración generada por Weblogo 3.4 (Crooks, y col., 2004)



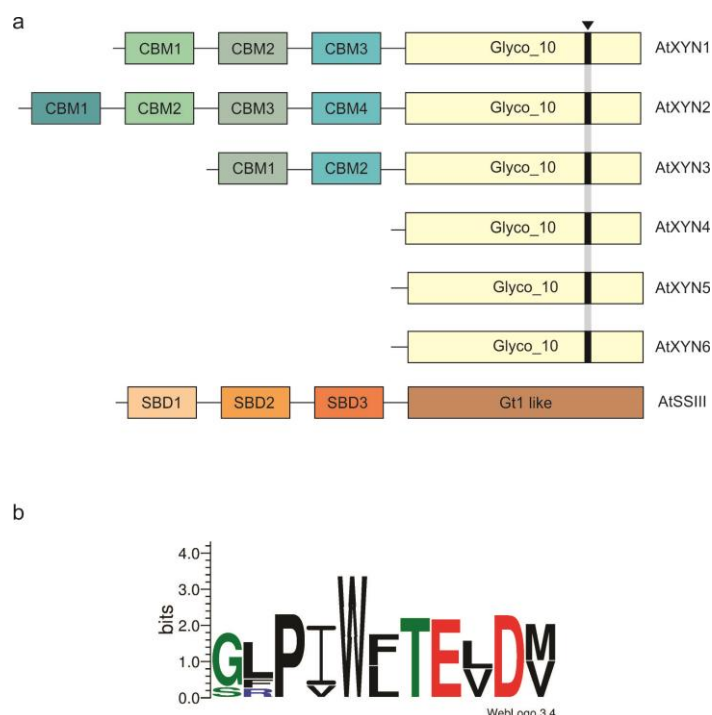
**Figura III-2 Mecanismo de retención para una  $\beta$ -glucosidasa del tipo GH10.**  
Ilustración modificada de (Lairson, y col., 2008)

que se rompe el enlace liberando el glucósido. En el segundo paso (deglucosilación), el intermediario es hidrolizado por agua, con el otro residuo actuando ahora como un catalizador básico, desprotonando la molécula de agua (McIntosh, y col., 1996).

*A. thaliana* presenta seis genes que codifican xilanasas (Figura III-3a): ATXYN1(AT1G58370, Q9SM08), AtXYN2 (AT1G10050, O80596), AtXYN3 (AT4G08160, Q8GYW5), AtXYN4 (AT2G14690, Q680B7), AtXYN5 (AT4G33810, O81897) (Suzuki, y col., 2002) y AtXYN6 (AT4G33820, Q84WT5). En la Figura III-3b se muestra el sitio conservado catalítico de las seis xilanasas de *A. thaliana* (Suzuki, y col., 2002) observándose la presencia de la secuencia característica de las GH10 (GLPIWFTLDV) localizada entre los residuos 784 and 794 de ATXYN1, que se corresponden perfectamente con la secuencia consenso del sitio activo de esta familia (Figura III-1).

De las seis xilanasas presentes en *Arabidopsis*, sólo ATXYN1 ha sido estudiada previamente. Ésta se expresa predominantemente en los haces vasculares de la planta y cataliza la degradación del xilano (Suzuki, y col., 2002). Llamativamente, ATXYN1 presenta la misma estructuración modular que la almidón sintasa SSIII de *A. thaliana* (Locus ID AT1G11720, Uniprot ID F4IAG1), previamente caracterizada en nuestro laboratorio, en la que el dominio catalítico C-terminal (dominio glucógeno sintasa tipo GT1) se encuentra unido a tres módulos no catalíticos de unión a almidón (CBM familia 53). Los CBM de ATXYN1 fueron clasificados en la familia CAZy 22 (previamente familia 4\_9) (Cantarel, y col., 2009a). La presencia de dominios de la misma familia ubicados en tándem se denomina “configuración homogénea” y





**Figura III-3 Esquema de las xilanasas GH10 de *A. thaliana*.**

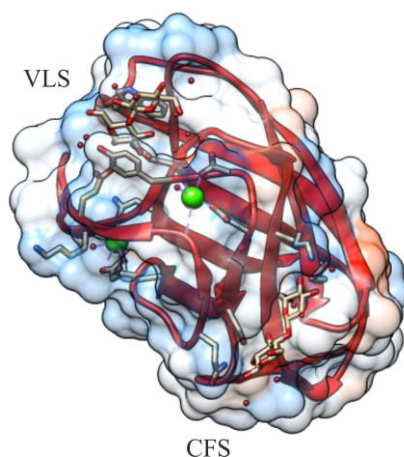
a) Comparación de la estructura modular de las xilanasas de (ATXYN1-6) y la almidón sintasa III (AtSSIII). b) Secuencia consenso del sitio activo de las GH10. Ilustración generada por Weblogo 3.4 (Crooks, y col., 2004).

se presume que estos CBM presentan mecanismos de unión similares (normalmente unen el mismo ligando) y que surgen por duplicación. En cambio, la configuración heterogénea (CBM de distintas familias) pueden interpretarse como eventos de duplicación que llevan a la adquisición de una nueva funcionalización (Voordeckers, y col., 2012).

A pesar de ser análogos a las lectinas, los CBM se diferencian por su asociación a enzimas involucradas en el metabolismo de hidratos de carbono. Sin embargo, los escasos miembros de los CBM que no se encuentran asociados a ningún dominio catalítico son llamados CBM huérfanos (Abbott y van Bueren, 2014). Actualmente se han utilizado algunas estrategias para deducir la especificidad de los CBM a partir de la estructura primaria, generando modelos de las estructuras terciarias. A partir de la rápida expansión de la metagenómica y el aumento en el número de CBM caracterizados estructuralmente, se han identificado varios aspectos conservados estructural y funcionalmente entre las diversas familias. Por ejemplo, se ha probado que el plegamiento en  $\beta$ -sándwich es un plegamiento abundante entre los diversos CBM cristalizados. La plasticidad de este dominio, se destaca por la presencia de dos regiones superficiales para el posicionamiento de los sitios de unión. Estos incluyen un sitio variable tipo

bucle (VLS de “variable loop site”) que interconecta láminas  $\beta$  en un extremo del  $\beta$ -sándwich y el sitio de la cara cóncava (CFS de “concave face site”), localizada en la región formada por las láminas  $\beta$  (Abbott y van Bueren, 2014). Se han reportado casos en que ambos sitios son operacionales dentro de la misma proteína (Henshaw, y col., 2004; Jiang, y col., 2012). En la Figura III-4 se muestra la ubicación de los sitios VLS y CFS en la superficie del CBM6 de *Cellvibrio mixtus* (pdbID: 1UYY) (Henshaw, y col., 2004). En toda la superfamilia CBM se ha demostrado que el sitio VLS interacciona con una diversa gama estructuras, incluyendo distintas conformaciones en los anillos de los hidratos de carbono, epímeros, anómeros, y varios grados de polimerización de los ligandos (Abbott y van Bueren, 2014). De esta manera, la capacidad del VLS para unir diversas estructuras sugiere que estos bucles proveen una plataforma ajustable para acomodar ligandos con diferentes requerimientos de profundidad y forma. Alternativamente, el sitio CFS acomoda predominantemente  $\alpha$  y  $\beta$  glucanos. Este perfil más restringente se puede deber a la limitada flexibilidad de los residuos aromáticos ubicados en la superficie de una lámina  $\beta$  (Abbott y van Bueren, 2014).

Uno de los grandes desafíos en la investigación de CBM es la determinación de su especificidad de ligando. Este proceso requiere la identificación de la secuencia específica de los módulos a evaluar, expresar la proteína en cantidades suficientes para determinar el ligando correcto utilizando el ensayo biofísico apropiado. Sin embargo, han surgido miembros de la superfamilia que complican una asignación directa del ligando apropiado. Por ejemplo, algunos miembros de



**Figura III-4 Ilustración de la estructura del CBM6 de *Cellvibrio mixtus*.**

La presencia de los dos sitios de unión se indica con la presencia de dímeros de xilosa y la nomenclatura VLS y CFS. Las esferas color verde representan un átomo de  $\text{Ca}^{+2}$  (pdbID: 1UYY). La imagen fue generada usando el programa UCSF Chimera (Pettersen, y col., 2004).

la familia CBM6 muestran afinidad promiscua por diversos sustratos; ciertos miembros de los módulos de unión a almidón (SBD) presentan arquitecturas modulares crípticas (por ejemplo, el doble sitio de unión) (Palopoli, y col., 2006; van Bueren, y col., 2007) y por último, algunos dominios presentan nuevos mecanismos de acción. Entre éstos, pueden nombrarse la oligomerización mediada por calcio (Montanier, y col., 2011), la disrupción de sustratos por óxido-reducción (Vaaje-Kolstad, y col., 2010) o la modulación de la especificidad enzimática (Cuskin, y col., 2012).

En los casos en los que la actividad de la enzima parental es conocida y la especificidad del CBM es conservada dentro de la familia a la cual pertenece, la caracterización resulta más sencilla. Este es el caso de los CBM perteneciente a la familia 22. Los CBM de varias familias muestran especificidad por xilano (por ejemplo, las familia 15, 2b, 35 y 22). Los miembros de familia 22, fueron considerados en un primer momento, como dominios estabilizadores de enzimas en organismos termófilos (Fontes, y col., 1995; Charnock, y col., 2000). Sin embargo, el hecho de que no estén restringidos a enzimas termofílicas promovió el análisis de las propiedades de unión de los mismos, demostrando claramente su capacidad de unión a xilano y xilo-oligosacáridos (Meissner, y col., 2000).

En este capítulo nos proponemos la caracterización estructural y funcional de los dominios CBM de la xilanasa ATXYN1.

## **Resultados:**

### **Análisis bioinformático, evolutivo y modelado de la estructura tridimensional de los CMB de ATXYN1**

#### **Alineamientos de secuencias:**

Comenzamos evaluando la identidad de la secuencia aminoacídica de estos CBM frente a distintas bases de datos, utilizando la herramienta DELTA-BLAST (Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST) (Boratyn, y col., 2012). Inicialmente, se han utilizado las secuencias aminoacídicas de estos dominios como consulta frente a una base de datos curada de proteínas (UniProtKB/Swiss-Prot). Para esto, se han configurado los parámetros del algoritmo con una longitud de palabra de 3, una matriz BLOSUM62 (debido a que la misma se encuentra basada en regiones altamente conservadas y en observaciones directas en la sustitución de aminoácidos) y un costo de GAP predeterminado. Como resultado se obtuvo una lista de proteínas con alta significancia, pero valores de identidad de secuencia llamativamente bajos (alrededor de 20%)

	UniProtKB Entry	Nombre	Enzima	Especie	E-value	Identidad (%)
XYL1	P36917	XYNA	endo-1,4-β-D-xilanasasa	<i>T. saccharolyticum</i>	1,00e <sup>-18</sup>	22
	P38535	XynX	exo-1,4-β-D-xilanasasa	<i>C. thermocellum</i>	2,00e <sup>-18</sup>	22
	Q60042	XynA	endo-1,4-β-D-xilanasasa	<i>T. neapolitana</i>	1,00e <sup>-17</sup>	19
	Q60037	XynA	endo-1,4-β-D-xilanasasa	<i>T. maritima</i>	4,00e <sup>-17</sup>	21
	O69230	XynC	endo-1,4-β-D-xilanasasa	<i>P. barcinonensis</i>	6,00e <sup>-15</sup>	21
XYL2	Q60042	XYNA	endo-1,4-β-D-xilanasasa	<i>T. neapolitana</i>	1,00e <sup>-18</sup>	21
	Q60037	XYNA	endo-1,4-β-D-xilanasasa	<i>T. maritima</i>	2,00e <sup>-18</sup>	21
	P36917	XYNA	endo-1,4-β-D-xilanasasa	<i>T. saccharolyticum</i>	4,00e <sup>-16</sup>	26
	Q53317	XYND	exo-1,4-β-D-xilanasasa	<i>R. flavefaciens</i>	1,00e <sup>-14</sup>	23
	P38535	XYNX	endo-1,4-β-D-xilanasasa	<i>C. thermocellum</i>	5,00e <sup>-14</sup>	22
XYL3	P36917	XYNA	endo-1,4-β-D-xilanasasa	<i>T. saccharolyticum</i>	3,00e <sup>-19</sup>	22
	P38535	XYNX	exo-1,4-β-D-xilanasasa	<i>C. thermocellum</i>	2,00e <sup>-18</sup>	21
	O69230	XYNC	endo-1,4-β-D-xilanasasa	<i>P. barcinonensis</i>	2,00e <sup>-15</sup>	19
	Q60042	XYNA	endo-1,4-β-D-xilanasasa	<i>T. neapolitana</i>	7,00e <sup>-14</sup>	14
	Q60037	XYNA	endo-1,4-β-D-xilanasasa	<i>T. maritima</i>	6,00e <sup>-12</sup>	13

**Tabla III-1 Resumen de la salida del DELTA-BLAST.**

Comparación realizada contra la base de datos curada (UniProtKB/Swiss-Prot)

en las regiones de cobertura respecto a los 3 dominios XYL. En la Tabla III-1 se indican los ID de las secuencias proteicas con mayor puntaje para cada dominio consulta ensayado, siendo todos de la Familia CBM22. Así, nuestra primera aproximación en la caracterización de estos dominios nos ha sugerido que la clasificación de estos dominios por homología en la familia 22 sería correcta.

Para continuar la caracterización estructural, se prosiguió a buscar los dominios CBM (con estructura terciaria conocida) con mayor grado de identidad de secuencia frente a los dominios XYL. Para esto se utilizó nuevamente la herramienta DELTA-BLAST frente a una base de datos de estructuras proteicas (Protein Data Bank). Esto se llevó a cabo con el objetivo de

encontrar las secuencias disponibles con mayor porcentaje de identidad para ser utilizadas como molde en un modelado por homología. De esta forma, en la Tabla III-2 se muestran las primeras 5 proteínas para cada dominio. En esta tabla se indica el ID de la estructura (pdb ID), el nombre de la proteína, la familia y la especie a la que pertenece. Las estructuras seleccionadas para todos los dominios XYL pertenecen a las familias CBM22 o CBM4. La familia CBM4 consiste en un grupo de dominios de 150 residuos encontrados en enzimas bacterianas, con demostrada afinidad por xilano,  $\beta$ -1,3-glucano,  $\beta$ -1,3-1,4-glucano,  $\beta$ -1,6-glucano y celulosa amorfa (pero no cristalina).

Debido a que los porcentajes de identidad de los dominios obtenidos presentan valores que rondan el 20% (Tabla III-2) y teniendo en cuenta que la longitud de las secuencias es de 150 AA en promedio, podemos concluir que nos encontramos en una zona poco favorable para el

	PDB ID	ID†	CBM	Proteína	Especie	I (%)	S. (%)
XYL1	4XUO	O69230	22	xilanasa (CBM1)	<i>P. barcinonensis</i>	21	36
	3P6B	O68438	4	celobiosidasa	<i>C. thermocellum</i>	12	27
	4XUP	O69230	22	xilanasa (CBM1-CBM2)	<i>P. barcinonensis</i>	21	36
	4XUN	O69230	22	xilanasa (CBM2)	<i>P. barcinonensis</i>	18	36
	1GUI	Q9WXN1	4	xilanasa (CBM2)	<i>T. maritima</i>	13	24
XYL2	4XUO	O69230	22	xilanasa (CBM1)	<i>P. barcinonensis</i>	23	47
	4XUP	O69230	22	xilanasa (CBM1-CBM2)	<i>P. barcinonensis</i>	23	47
	4XUN	O69230	22	xilanasa (CBM2)	<i>P. barcinonensis</i>	16	35
	3P6B	O68438 P0C2S1	4	celobiosidasa	<i>C. thermocellum</i>	9	24
	1H6X	P51584	22	xilanasa	<i>C. thermocellum</i>	16	33
XYL3	4XUO	O69230	22	xilanasa (CBM1)	<i>P. barcinonensis</i>	19	39
	4XUP	O69230	22	xilanasa (CBM1-CBM2)	<i>P. barcinonensis</i>	19	39
	4XUN	O69230	22	xilanasa (CBM2)	<i>P. barcinonensis</i>	18	32
	3P6B	O68438	4	celobiosidasa	<i>C. thermocellum</i>	8	23
	3K4Z	A3DCH2	4	Glucanasa	<i>C. thermocellum</i>	9	2

**Tabla III-2 Resumen de la salida del DELTA-BLAST (PDB).**

Comparación realizada contra la base de datos curada (Protein Data Bank). (†) UniprotID; (I.) porcentaje de identidad; (S.) porcentaje de similitud. Xilanasa (endo-1,4- $\beta$ -D-xilanasa); celobiosidasa (celulosa 1,4- $\beta$ -celobiosidasa); glucanasa (endo-1,4- $\beta$ -glucanasa).

CBM	XYL1	XYL2	XYL3
XYL1	-	26/50	29/50
XYL2	26/50	-	25/46
XYL3	29/50	25/46	-

**Tabla III-3 Comparación de los porcentajes de identidad y similitud entre los dominios XYL de ATXYN1.**

Los valores representados en la tabla muestran el porcentaje de identidad (%) / porcentaje de similitud (%).

modelado por homología (“twilight zone”). Sin embargo, debido a que los porcentajes de similitud son >40%, es posible intentar realizar un alineamiento satisfactorio (Rost, 1999). En la Tabla III-3, se muestran los porcentajes de identidad y de similitud que existe entre los dominios XYL de ATXYN1. Así, los porcentajes de identidad observados entre estas secuencias se encuentran entre el 25 y 30%, mientras que los porcentajes de similitud oscilan cerca al 50%.

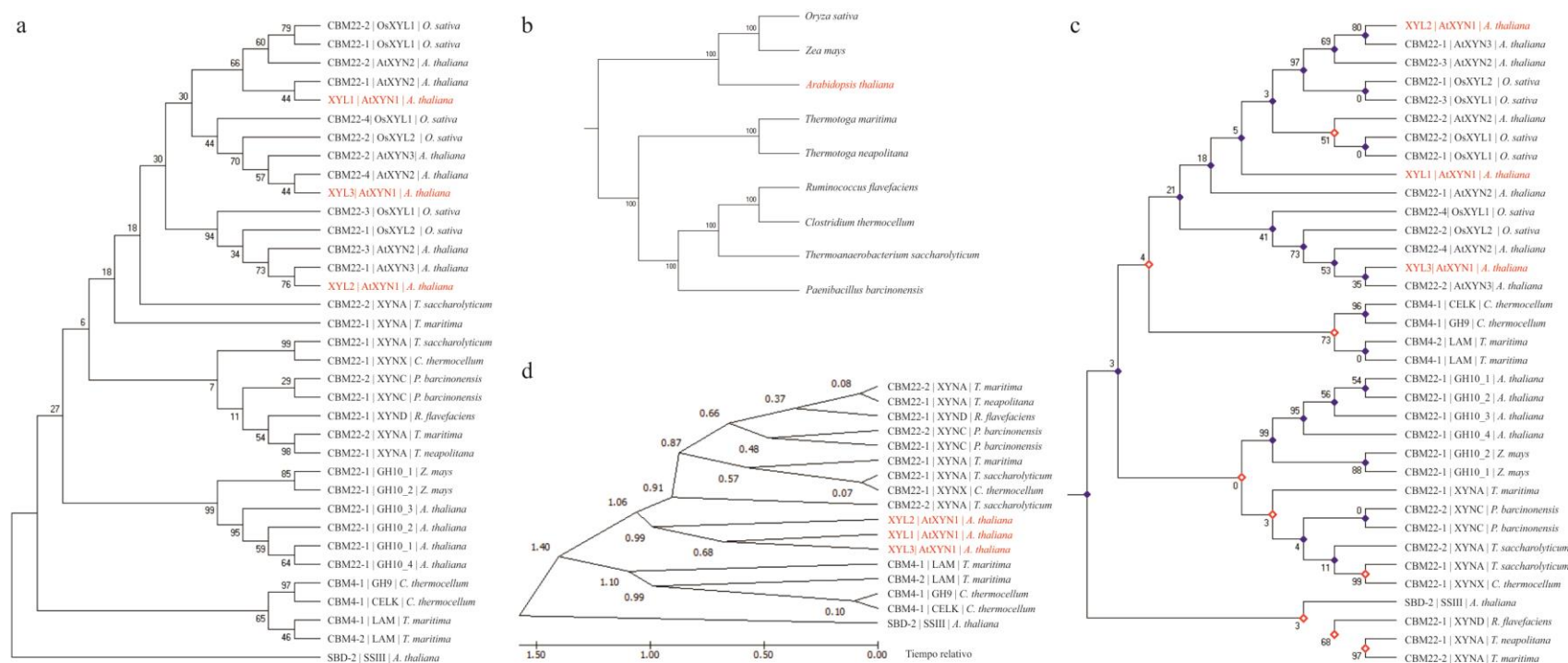
### Alineamiento múltiple en la familia 22

La base de datos de CAZy (<http://www.cazy.org/>) clasifica a todas las proteínas que contienen CBM en función de los mismos. Sin embargo, no es posible acceder de una forma directa a las secuencias de los dominios indicados. Por ello, utilizando el lenguaje de programación Perl se recuperaron los códigos identificadores de Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) de cada proteína. A partir de la herramienta de consulta en bloque (“batch retrieval”), se obtuvo la secuencia completa de estas proteínas y, posteriormente, se analizó cada secuencia mediante la herramienta CDsearch del NCBI (Marchler-Bauer y Bryant, 2004; Marchler-Bauer, y col., 2009; Marchler-Bauer, y col., 2011; Marchler-Bauer, y col., 2012) obteniendo coordenadas de los dominios CBM, las cuales fueron utilizadas para sustraer las secuencias requeridas a partir de las secuencias proteicas completas. De esta forma, se logró obtener una base de datos en la cual es posible identificar la secuencia de los CBM filtrando según la familia o la especie en la que se encuentra (ver Anexo II). La base de datos generada (con más de 30000 secuencias) fue cargada y procesada con MySQL generando las consultas apropiadas para cada caso. De esta forma, se obtuvieron 351 secuencias proteicas pertenecientes a la familia 22 (<http://www.cazy.org/CBM22.html>). Al mismo tiempo, hemos seleccionado las secuencias de los CBM de cada una de ellas (1, 2 o 3 por cada proteína) a partir de la herramienta CDD (Conserved Domain del NCBI) obteniendo un total de 512 secuencias de CBM22.

Sumado a estas secuencias hemos agregado las correspondientes a las estructuras indicadas en la Tabla III-2 (pertenecientes a la familia CBM4: A3DCH2, O68438, P51584 y 9WXN1) y una secuencia perteneciente a un grupo externo previamente caracterizada en nuestro laboratorio (SBD2 de AtSSIII, F4IAG1). El alineamiento múltiple de las secuencias fue generado mediante MUSCLE (Edgar, 2004) debido a que implementa un algoritmo que permite optimizaciones progresivas durante todo el proceso. El alineamiento fue generado utilizando los parámetros predeterminados para un alineamiento múltiple, eliminando los gaps iniciales (para evitar que influyan sobre el alineamiento) y un máximo de 8 iteraciones para evitar la dependencia con los alineamientos iniciales. Fue necesario incluir en el alineamiento la mayor cantidad de secuencias posible para contrarrestar el efecto del bajo porcentaje de identidad.

### **Inferencias Filogenéticas a partir de los alineamientos Múltiples de la Familia CAZy 22**

El alineamiento múltiple realizado fue utilizado para generar inferencias filogenéticas con el programa MEGA 7 (Kumar, y col., 2016) a partir del método de máxima parsimonia. Todas las secuencias obtenidas en el punto anterior fueron utilizadas para generar un alineamiento múltiple de la familia CBM22. Para simplificar el análisis filogenético de los dominios XYL, decidimos comparar los mismos con un subgrupo de secuencias. Entre ellas, utilizamos los dominios con mayor identidad (Tabla III-1), los dominios moldes (Tabla III-2), un grupo externo (SBD2) que servirá para localizar la raíz del árbol, y secuencias de la familia 22 pertenecientes a plantas superiores como *A. thaliana*, *O. sativa* y *Z. mays*. El árbol consenso (remuestreo) observado en la Figura III-5a, fue inferido a partir de 1000 replicados y fue utilizado para representar la historia evolutiva de la familia CBM22. El análisis involucró 35 secuencias aminoacídicas en las cuales todas las posiciones ambiguas (gaps y datos faltantes) fueron eliminadas quedando un total de 40 posiciones informativas en el conjunto final de datos. A partir del árbol obtenido, podemos observar la presencia de al menos 5 grupos de secuencias con poca información filogenética entre ellos, debido al bajo porcentaje de identidad. Sin embargo, observamos que los tres dominios XYL se encuentran evolutivamente cerca entre sí y se agrupan con los CBM asociado a xilanasas de plantas (*Z. mays*, *O. sativa* y *A. thaliana*) en lugar de los CBM asociados a bacterias. Esto es llamativo, debido a que los CBM bacterianos han obtenido un mejor puntaje en los alineamientos basados en la similitud de BLAST (Tabla



**Figura III-5 Estudio evolutivo de las secuencias aminoacídicas de los dominios XYL de ATXN1.**

a) Análisis de máxima parsimonia de los taxones: Topología del árbol obtenido, en la que la longitud de las ramas no se corresponden con distancias evolutivas. El remuestreo (a partir de los 1000 replicados) fue realizado para evaluar la confiabilidad del árbol inferido. El porcentaje en el que los taxones se encuentran asociadas se muestra al lado de los nodos (Felsenstein, 1985). El árbol MP fue obtenido utilizando el algoritmo SPR (“Subtree-Pruning-Regrafting”) (Nei y Kumar, 2000) con un nivel de búsqueda igual a 1, en el cual los árboles iniciales fueron obtenidos por adiciones al azar de secuencias (10 replicados). b) Árbol de especies obtenido de la sección taxonomía del NCBI (Sayers, y col., 2009). c) Árbol que describe los eventos de duplicación y especiación basados en el alineamiento de toda la familia CBM22. Los diamantes cerrados indican duplicación, mientras que los diamantes abiertos indican especiación. d) Árbol de tiempo relativo a la secuencia SBD2 de SSIII utilizada como grupo externo. El largo de rama es proporcional a la escala de tiempo. En las ramas se indica el valor de tiempo relativo para cada rama. Todas las ilustraciones fueron generadas con el programa MEGA7 (Kumar, y col., 2016).



III-1). Sin embargo, esto se explica porque los alineamientos basados en similitud no pueden utilizarse como inferencias filogenéticas debido a que no están basados en un alineamiento global óptimo, en el que todas las secuencias se encuentren representadas.

A partir del árbol filogenético obtenido se procedió a evaluar posibles eventos de duplicación de los dominios basados en un árbol de especies (Figura III-5b) (Sayers, y col., 2009) mediante el programa MEGA7 (Zmasek y Eddy, 2001). El árbol utilizado para el análisis era no enraizado de manera que el nuevo enraizamiento encontrado surgiera con el número mínimo de eventos de duplicación posible. De esta forma, se obtuvieron 25 duplicaciones génicas (diamantes cerrados) y 9 eventos de especiación (diamantes abiertos) (Figura III-5c). Se propone que existen dos modelos para describir la emergencia de arquitecturas simétricas a partir de un motivo peptídico primordial. En el modelo de “arquitectura emergente” el péptido primordial se pliega autónomamente para formar un dominio independiente, mientras que la arquitectura simétrica compleja se forma por eventos de duplicación y fusión. En el segundo modelo (modelo de arquitectura conservada) la arquitectura compleja se presenta en cada paso de la evolución (Lee y Blaber, 2011).

A partir de los datos obtenidos, se puede observar que los dominios XYL surgen como duplicaciones y fusiones dando a lugar a un polipéptido contiguo. Ya ha sido reportado que los CBM13, y todos los miembros de procariotas de la familia 13, pueden haberse derivado a partir de un evento de triplicación. A partir del árbol de tiempo (Figura III-5d) podemos observar que las secuencias provenientes de los dominios XYL han aparecido antes en el tiempo en comparación con las secuencias provenientes de bacterias. Esto ya ha sido sugerido por Boraston y colaboradores (Boraston, y col., 2000), en donde se propone que integrantes de la familia CBM13 en plantas, transfieren estos dominios a un ancestro procariótico. Posteriormente, la distribución de la familia CBM13 observada actualmente fue generada mediante la transferencia horizontal entre microorganismos.

A partir del alineamiento obtenido en el paso anterior llevamos a cabo el modelado en Swiss-model (Arnold, y col., 2006) en el modo alineamiento. Este servidor además de realizar el modelado a partir de diversos modos (automático y alineamiento), realiza la valoración de la estructura por distintos métodos entre ellos QMEANscore (Benkert, y col., 2009) y el Z-score. Este último parámetro puede tomar los siguientes valores según la confiabilidad de la estructura:  $|Z| < 1$ , estructura óptima;  $1 < |Z| < 2$ , estructura aceptable;  $|Z| > 2$  estructuras de baja calidad. Utilizando esta metodología, se obtuvieron modelos de muy baja calidad con un Z-score de -5.71 para el modelo XYL1-4XUO (Sainz-Polo, y col., 2015); -5,47 para el modelo XYL2-

4XUO y de -5,39 para XYL3-4XUO. Teniendo en cuenta esto, realizamos el modelado mediante el modo automático obteniendo Z-score igualmente malos: -4.53 para XYL1-4XUP; -4,72 para XYL2-4XUO; y -3,84 para XYL3-4XUP. Esto era esperable debido al bajo porcentaje de identidad entre las secuencias consulta y las secuencias molde. Todas las xilanasas usadas como molde presentan un sitio de unión a  $\text{Ca}^{+2}$ .

### Modelado por homología basado en alineamiento estructural

Debido a que los algoritmos en los alineamientos tratan de maximizar la similitud en el alineamiento de secuencias, utilizamos el servidor de Phyre2 (Kelley, y col., 2015) ya que necesitamos maximizar la similitud estructural entre las secuencias molde y consulta. Adicionalmente, este programa utiliza información accesorio (como la predicción de estructura secundaria) para mejorar el alineamiento y el modelo de salida. Además, Phyre2 incorpora una simulación de plegamiento *ab initio* en las regiones en que las proteínas no presentan homología detectable con estructuras conocidas. Una vez obtenidos los modelos, los mismos fueron evaluados utilizando el método evaluación de estructuras (“structure assessment”) de Swiss-model (<http://swissmodel.expasy.org/>) (Arnold, y col., 2006). De esta forma, obtuvimos modelos aparentemente más confiables pero aún de baja calidad para cada dominio con Z-score de -2.22 para XYL1-2W5F (Najmudin, y col., 2010); -2.82 para XYL2-2W5F; y -2.81 para XYL3-2W5F.

### Enhebrado molecular

Teniendo en cuenta el bajo porcentaje de identidad entre las secuencias consulta y molde, se decidió evaluar la determinación de estructura terciaria a partir del método de enhebrado proteico (“protein threading”). Este procedimiento se utiliza para aquellas proteínas que tendrían un plegamiento conocido pero que no presentan homología con proteínas de estructura comprobada experimentalmente. Se basa en que el número de plegamientos en la naturaleza es de aproximadamente 1300 y en que el 90% de las estructuras ingresadas al PDB en los últimos 3 años presentan similitud estructural con las que ya se encontraban. RaptorX (Peng y Xu, 2011) utiliza un algoritmo que relaciona el conocimiento estadístico de estructuras depositadas en el PDB y la secuencia de la proteína que uno quiere modelar. La predicción se lleva a cabo “enhebrando” cada aminoácido de la secuencia consulta en una posición de la estructura molde, y evaluando la estructura resultante. Después de seleccionar la estructura que mejor ajusta, se corrige el mismo basado en el alineamiento entre la secuencia consulta y la secuencia molde. De esta manera, se obtuvo un modelo para cada dominio con una valoración aceptable, basados principalmente en los dominios CBM22 de PbXYNC (Tabla III-4).

CBM	PDB ID <sup>†</sup>	Z-Score	QMEAN6 score
<b>XYL1</b>	-	-0.390	0.706
	3P6BA	-4.580	0.329
	1GUIA	-0.560	0.691
<b>XYL2</b>	-	-1.820	0.578
	4XUR	-2.118	0.539
	2W5F	-2.568	0.512
<b>XYL3</b>	-	-1.520	0.607
	4XUR	-2.850	0.485
	4XUP	-3.130	0.460

**Tabla III-4 Descripción de los modelos obtenidos luego del refinamiento estructural.**

Se detallan las estructuras de referencias. Los parámetros de validación de modelo (Z-score y QMEAN6) corresponden a los modelos obtenidos en cada proceso de refinamiento. Se resaltan en negrita los mejores parámetros de validación obtenidos. (†) de la estructura de referencia.

### Refinamiento del Modelo

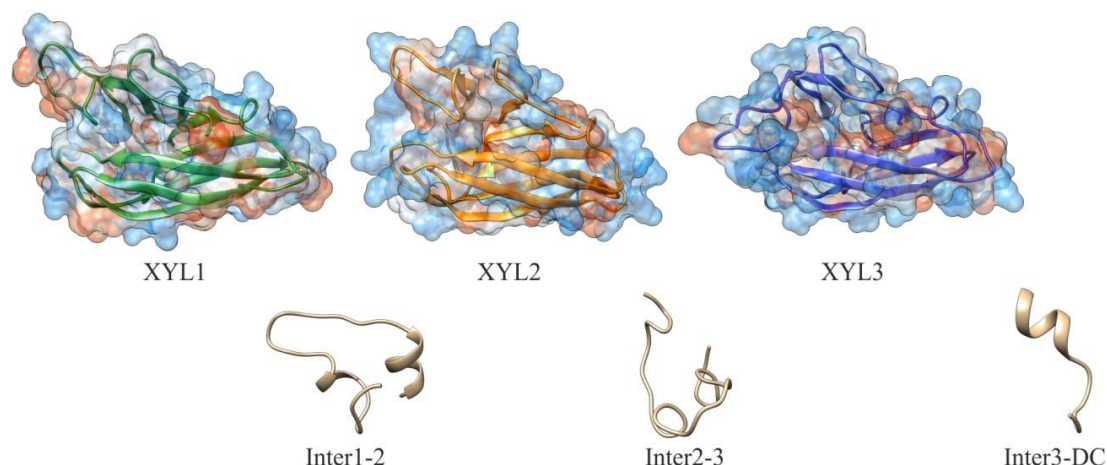
Adicionalmente se procedió a refinar los modelos obtenidos mediante el programa ModRefiner (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/ModRefiner/>) (Xu y Zhang, 2011). El objetivo principal de este programa es minimizar la energía del modelo teniendo en cuenta dos criterios: la obtención de una topología aceptable de la cadena principal de C<sub>α</sub>, y la obtención de detalles atómicos físicamente realistas mejorando las calidades estructurales locales. Este programa permite la utilización de una estructura de referencia cuya cadena de C<sub>α</sub> se utiliza para guiar el refinamiento. De esta manera, se llevó a cabo el refinamiento de los modelos en ausencia de cadenas de carbono de referencia y en presencia de ellas y, posteriormente, la evaluación de los mismos de idéntica forma a los pasos anteriores.

En la Tabla III-5 se observan los parámetros de calidad de los modelos refinados obtenidos. De esta forma, según los parámetros de validación estructural, elegimos los modelos refinados de

CBM	Estructuras de Referencia	Z-Score	QMEAN6 score
<b>XYL1</b>	4xuoA; 2wysA; 1h6YA; 4xupA; 1guiA	-1.180	0.635
<b>XYL2</b>	1h6yA; 2wysA; 4xuoA; 4xupA; 4xunA	-1.901	0.572
<b>XYL3</b>	4xupA; 4xuoA; 4xunA; 1h6yA; 2wysA	-1.11	0.644

**Tabla III-5 Descripción de los modelos obtenidos por enhebrado molecular.**

Se detallan las estructuras de referencias, resaltándose con negrita los mejores moldes utilizados en cada caso. Los parámetros de validación de modelo (Z-score y QMEAN6) corresponden al mejor modelo obtenido.



**Figura III-6 Ilustración de los modelos de los dominios XYL de ATXYN1.**

Se puede observar que los tres modelos están constituidos en su totalidad por láminas  $\beta$  y bucles no estructurados. Las superficies proteicas permiten observar la presencia de una hendidura en la posición del VLS. Las estructuras de las regiones interdominio fueron predichas con el programa PEPFOLD 3.1 (Thevenet, y col., 2012; Shen, y col., 2014). Las imágenes fueron generadas usando el programa UCSF Chimera (Pettersen, y col., 2004).

XYL1 y XYL2 y el modelo sin refinar de XYL3.

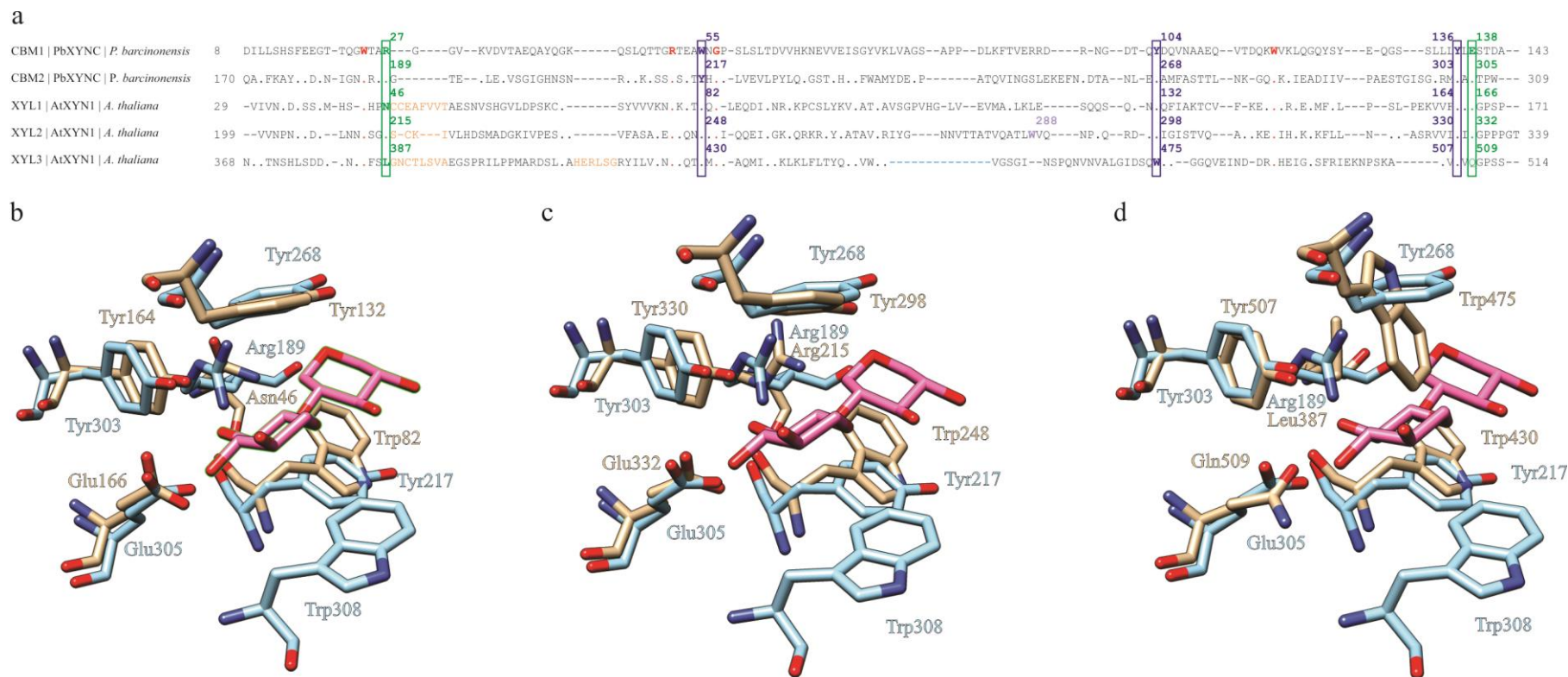
Los tres modelos obtenidos (Figura III-6) consisten en un  $\beta$ -sándwich (“ $\beta$ -jelly roll”) con un surco superficial que constituye el sitio de unión al ligando. La xilanasa XYN10C de *Paenibacillus barcinonensis* (Uniprot ID: O69230) que fue cristalizada en presencia de xilotetraosa, fue utilizada como molde para los tres dominios. Ésta presenta dos dominios en tándem, correspondientes a un dominio CBM1 (residuo 1-159) y un dominio CBM2 (residuos 171-334) separados por un bucle flexible rico en residuos de prolina y glicina <sup>160</sup>PENPGEPGEAG<sup>170</sup> (Sainz-Polo, y col., 2015). Debido a que la flexibilidad de estas regiones es esencial para la función enzimática, hemos decidido evaluar las propiedades estructurales de los mismos. De las tres regiones interdominio evaluadas, solo la región entre XYL2 y XYL3 presenta una secuencia similar (<sup>338</sup>DILLNSLTVKHAEKIPSPPPSIENPAFGV<sup>359</sup>) a la presente en entre los dominios CBM1 y CBM2 de PbXYN10C. Para analizar a fondo las tres secuencias interdominio realizamos la predicción de la estructura que tomarían estos péptidos con el programa PEPFOLD 3.1 (Thevenet, y col., 2012; Shen, y col., 2014). De esta manera, observamos que la región interdominio 2-3 presenta una flexibilidad evidente en concordancia con la presencia de un 43% de residuos de prolinas (en la región subrayada). Por otro lado, la región inter 1-2 (<sup>170</sup>GIDLLIQSVTIHRESEPELERVTAEDETI<sup>200</sup>) presenta una flexibilidad intermedia, definida por dos regiones estructuradas unidas por una región central más flexible.

Por último, la región inter 3-DC (<sup>519</sup>VAGLQIFPVDRDLARIKHLKRQCDKIRKRDVILKFAGVDSSKFSGASVRVRQIRNS<sup>573</sup>), presenta mayoritariamente una estructura secundaria tipo  $\alpha$ -hélice, seguida por una corta región de mayor flexibilidad.

### Posiciones de los residuos involucrados en la unión a polisacáridos

En la Figura III-7a se representa el alineamiento de las secuencias entre los dominios CBM1 y CBM2 de PbXYN10C, y los dominios XYL1, XYL2 y XYL3 de ATXYN1. En la misma, se resaltan los residuos conservados en todos los miembros de la familia CBM 22 (rojo), y los residuos putativos que forman el sitio de unión al ligando (azul). Tres residuos aromáticos provenientes del motivo de unión a sustrato, Trp55/Tyr217, Tyr104/Tyr268, and Tyr136/Tyr303 (numeración CBM22-1/CBM22-2 de PbXYN10C) circunscriben la plataforma hidrofóbica de unión a sustrato (Figura III-7b, c y d) ubicada en lo que previamente definimos como CFS (Abbott y van Bueren, 2014). La misma se encuentra en una hendidura de una longitud de 20 Å y 9 Å de profundo, a lo largo de la superficie cóncava del  $\beta$ -sándwich. En el medio de esta hendidura, sobresalen los residuos aromáticos que definen el sándwich hidrofóbico capaz de ubicar el sustrato. Las cadenas laterales Tyr82/248/430 en una cara de la plataforma y las Tyr132/298/475 en la otra cara (XYL1, XYL2, y XYL3, respectivamente) posicionan las unidades de xilosa centrales. A diferencia del molde PbXYN10C, ningún dominio XYL presenta un homólogo al Trp-308 (CBM2 PbXYN10C) en la cara inferior de la hendidura. Este residuo Trp-308 es un determinante directamente involucrado en la unión de ligandos, aunque el mismo sólo se encuentre en un bajo número de miembros de la familia CBM22. La mayoría de los mismos presentan una estructura modular asociados a enzimas GH10 de especies del género *Paenibacillus* o *Clostridium* que contienen el motivo (W/Y)YY.

Por otro lado, las Tyr164/330/507 en la otra cara superior, se apilan con los enlaces glucosídicos de las xilosas en la posición 2 y 3. La estructura molde presenta una Arg en la posición 189 (CBM2), la cual media una interacción polar con la xilosa en la posición 1 y con la xilosa en la posición 3 estabilizando la unión. De los tres dominios XYL, sólo XYL2 presenta una arginina en esta posición (Arg215). La hendidura del dominio molde posee, además, un residuo Glu (Glu- 138/Glu-305, numeración PbXYN10C) conservado. Sin embargo, únicamente XYL1 y XYL2 presentan estos residuos. Tanto los residuos de arginina como de glutamato son absolutamente requeridos para el reconocimiento de xilano en el CBM22-2 de XYN10b de *Clostridium thermocellum* (Xie, y col., 2001). De esta forma, las xilosas en la posición 2 y 3 se sostendrían fuertemente, mientras que las xilosas en los sitios 1 y 4 se encontrarían más relajadas.



**Figura III-7 Identificación de los residuos involucrados en la unión a sustrato por homología.**

a) Alineamiento de las secuencias de los dominios CBM 22 de PbXYN1OC y ATXYN1. Los residuos reemplazados por (.) implican que el mismo se encuentra conservado en toda la familia CBM22. En azul se marcan los residuos aromáticos probablemente involucrados en la unión a sustrato. En rojo se muestran residuos altamente conservados en la familia 22, pero no presentes en el sitio de unión. Los residuos polares marcados en verde estarían directamente interaccionando con las regiones polares (enlaces glucosídicos) de los sustratos, estabilizando la unión. Ubicación de los residuos determinantes en la interacción con sustrato, superpuestos con los del dominio CBM2 de PbXYN1OC. b) superposición XYL1-4XUR (r.m.s.d. 0.931 Å); c) superposición XYL2-4XUR (r.m.s.d. 0.971 Å); d) superposición XYL3-4XUR (0.874 Å). Las imágenes fueron realizadas con el programa UCSF Chimera (Pettersen, y col., 2004).

La identidad entre los dominios XYL es similar a la obtenida con cualquier miembro de la familia 22, sin embargo, la topología de los dominios se conserva y, de esta forma, los dominios modelados presentan una desviación de la raíz media cuadrática (r.m.s.d) de XYL3-1DYO 1.022 Å; XYL2-1DYO 0.986 Å; XYL1-1DYO 0.886 Å cuando se superponen con los otros miembros de la familia 22 estructuralmente conocidos, CBM22-1 de CtXYN10B (PDB ID 1DYO) (Najmudin, y col., 2010).

Trabajos previos (Suzuki, y col., 2002) mostraron que la xilanasa ATXYN1 completa es capaz de unirse a xilano. Parece probable que, debido a que estos residuos se encuentran expuestos y conservados, estén involucrados en la unión al ligando (Charnock, y col., 2000). Además, la ausencia de estos residuos aromáticos en el módulo CBM1 de CtXYNY, el cual no presenta la capacidad de unir xilano, brinda apoyo adicional a la participación de éstos en la unión al ligando.

En resumen, los modelos tridimensionales revelan la presencia de un hendidura superficial, la cual proponemos, en virtud de identidad de secuencia y analogía con lectinas, como en el sitio de unión al ligando.

### Análisis de unión de ligando por acoplamiento ("Molecular Docking")

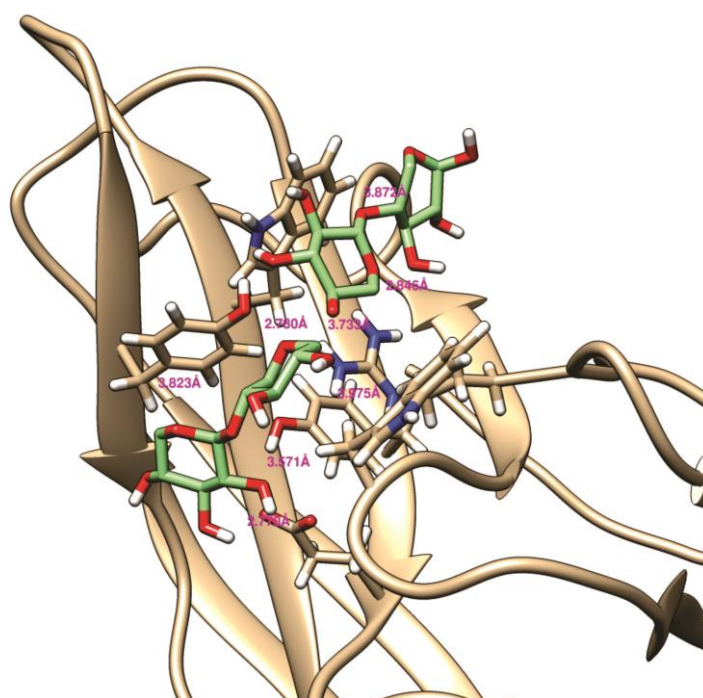
Los modelos obtenidos de los dominios CBM de ATXYN1, fueron utilizados para estudiar las conformaciones del complejo proteína ligando, utilizando tres sustratos distintos, los cuales pueden ser encontrados en la pared celular de *A. thaliana*. Como puede observarse en la Tabla III-6, para todas las combinaciones ensayadas, fueron obtenidas energías negativas indicando interacciones proteína-ligando favorables. Sin embargo, algunas interacciones presentan un número de torsiones elevadas que sugieren que no todas estas interacciones son entrópicamente favorables. Las dos interacciones más fuertes fueron las obtenidas para XYL1 y XYL2 con xilotetraosa (-6.8 y -6.6 kcal mol<sup>-1</sup>, respectivamente), indicando una propensión de estos

	Xilotetraosa	Celoheptaosa	Hexagalacturonato metilado
<b>XYL1</b>	-6.8	-5.3	-4.7
<b>XYL2</b>	-6.6	-5.8*	-6.3*
<b>XYL3</b>	-6.1*	-5.6*	-5.4*

**Tabla III-6 Valores de energía de interacción.**

Energía de interacción entre los dominios CBM de ATXYN1 y tres oligosacáridos representativos en la pared celular de *A. thaliana*. Los valores se encuentran informados en kcal mol<sup>-1</sup>. (\*) indica que se ha excedido el número máximo de 32 torsiones permitidas del ligando.

dominios por el xilano. Analizando las distancias entre los residuos involucrados en la unión y átomos específicos de los ligandos, se pueden deducir interacciones, tanto hidrofóbicas como hidrofílicas, las cuales pueden estabilizar la configuración del ligando en el sitio activo. En el caso de XYL1, la distancia entre el C1 del residuo Tyr132 y el C5 de la unidad de xilosa ubicada en la posición 2 es de 3.514 Å, favorable para la interacción hidrofóbica entre las dos estructuras. Conjuntamente, el C3 del Trp82 se encuentra ubicado a 3.922 Å del C3 de la xilosa ubicada en la posición 3. De esta forma, las dos unidades de xilosa centrales se sujetan por interacciones hidrofóbicas. El OH de la Tyr164 se encuentra a una distancia favorable de 3.500 Å del O2 de la xilosa ubicada en la posición 2, formando un puente de hidrógeno putativo. Sin embargo, el residuo Glu166 se encuentra relativamente alejado del enlace  $\beta$ -1,4 glucosídico entre la subunidad 1 y 2 de xilosa. En el caso de XYL2, observamos el arreglo de acoplamiento del ligando xilotetraosa en el sitio activo (Figura III-8). De esta forma, se detectan distancias apropiadas para la interacción hidrofóbica. Por un lado, existe una distancia de aproximadamente 3.8 Å entre la Tyr298 y las xilosas ubicadas en la posición 4, favoreciendo el apilamiento hidrofóbico. Sorprendentemente, el Trp288 también se encuentra en una posición



**Figura III-8 Distancias entre los residuos del sitio de unión de XYL2 y la xilotetraosa.**

Las distancias se muestran en Å (Armstrong). Los átomos de oxígeno de los residuos seleccionados se muestran en rojo, mientras que los nitrógenos se muestran en azul. La imagen fue realizada con el programa UCSF Chimera (Pettersen, y col., 2004).



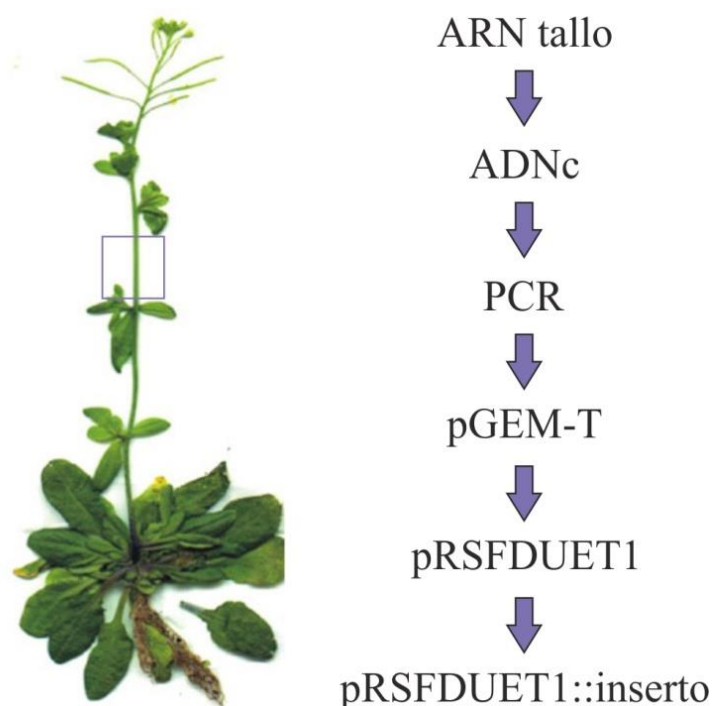
favorable para la interacción con la xilosa 1, a diferencia de las estructuras usadas como molde. Además, la Tyr298 interacciona mediante puentes de hidrógeno con el O5 de la xilosa 3. El Trp248 sostiene la xilosa de la posición 3 a 3.975 Å de distancia. Por ello, la principal diferencia con XYL1 se debe a la presencia y a la interacción favorable de los residuos Arg215 y Glu332. En el primer residuo, se producen dos enlaces puente de hidrógeno entre los dos nitrógenos protonados del grupo guanidino y el O asociado al C4 de la xilosa ubicada en la posición 2, y el O del C3 de la xilosa de la posición 1. El Glu302 interacciona con el OH del C4 de la xilosa ubicada en la posición 4. De esta forma, no solo observamos la estabilización de las xilasas centrales, sino también de las xilasas ubicadas en los extremos de la hendidura.

Si bien XYL3 presenta energías favorables para la interacción, el elevado número de torsiones sufridas por los ligandos sugieren que la misma no es favorable entrópicamente. De esta forma, XYL3 no sería capaz de localizar los oligosacáridos en el sitio de unión putativo. Probablemente la ubicación del Trp475 en la mitad de la hendidura del sitio de unión y la ausencia de los residuos de Glu y Arg, no favorezcan la interacción. Además, observamos que la interacción de XYL2 con pectina y celulosa, presenta torsiones elevadas por lo que las mismas no estarían favorecidas entrópicamente.

En resumen, este estudio *in silico* sugiere que tanto los dominios XYL1 como XYL2 presentan una mayor capacidad de unirse a xilano, en comparación con celulosa y pectina. Adicionalmente XYL2 presenta todos los residuos críticos y las distancias correctas, por lo que la interacción debería verse más favorecida. En las secciones siguientes trataremos de probar estas conclusiones, analizando las propiedades estructurales de los dominios y su interacción con distintos ligandos.

### **Clonado del extremo N-terminal de ATXYN1 de forma entera y parcial en un vector adecuado para su expresión heteróloga en *E. coli*.**

Para obtener el ADN complementario (ADNc), se extrajo ARN total tallos de *A. thaliana*, debido a que la expresión de este gen fue reportada en los haces vasculares (Suzuki, y col., 2002), siguiendo el protocolo ya descrito en materiales y métodos. Para la amplificación de los ADNc completo y parciales del gen *ATXYN1*, se utilizaron los cebadores indicados en la Tabla B-2. Los mismos fueron diseñados para incorporar al producto de PCR obtenido los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción Sac I (extremo 5') y Kpn I (extremo 3').



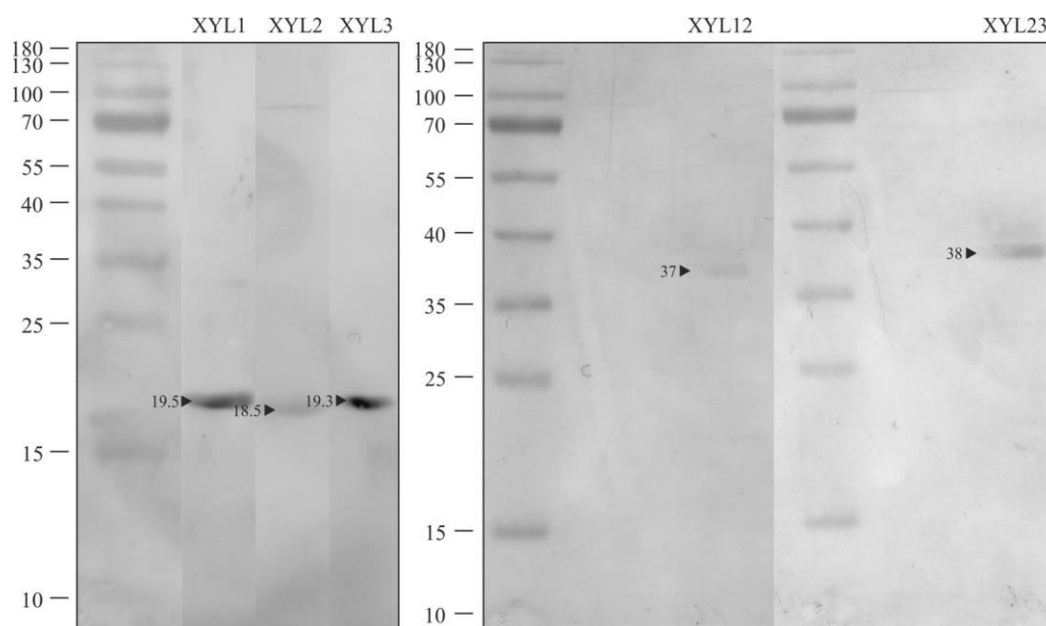
**Figura III-9 Esquema del clonado del extremo N-terminal de ATXYN1.**  
Referirse a materiales y métodos para más detalles.

Los fragmentos amplificados obtenidos, correspondientes a la región codificante del gen *ATXYN1*, fueron clonados en el vector pGEM-T Easy y posteriormente en el vector pRSFDuet. Los plásmidos resultantes se nombraron según la nomenclatura pRSFDuet::inserto (Figura III-9).

Los vectores recombinantes obtenidos fueron utilizados para transformar bacterias competentes *E. coli* BL21(DE3)/pLys, y a correcta expresión de distintos clones, fue evaluada mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes y detección inmunológica (“western blot”) con anticuerpos anti-His (Santa Cruz Biotech). (Figura III-10)

### **Purificación de las proteínas recombinantes empleando matrices de $\text{Ni}^{2+}$**

El vector de expresión utilizado codifica una secuencia de 6 residuos consecutivos de histidina que se une a cationes divalentes (e.g.  $\text{Ni}^{2+}$ ), lo que permite la purificación de las proteínas de fusión obtenidas en una matriz de afinidad. Los métodos de purificación variaron ligeramente según cada proteína. En el caso de XYL1 y XYL2, si bien la proteína recombinante se encontraba mayormente en la fracción insoluble, la cantidad obtenida en la fracción soluble resultó suficiente para llevar a cabo la purificación desde esta fracción. Los sedimentos celulares (rendimiento: 2 g de células) se resuspendieron, sonicaron y la fracción soluble se sometió a



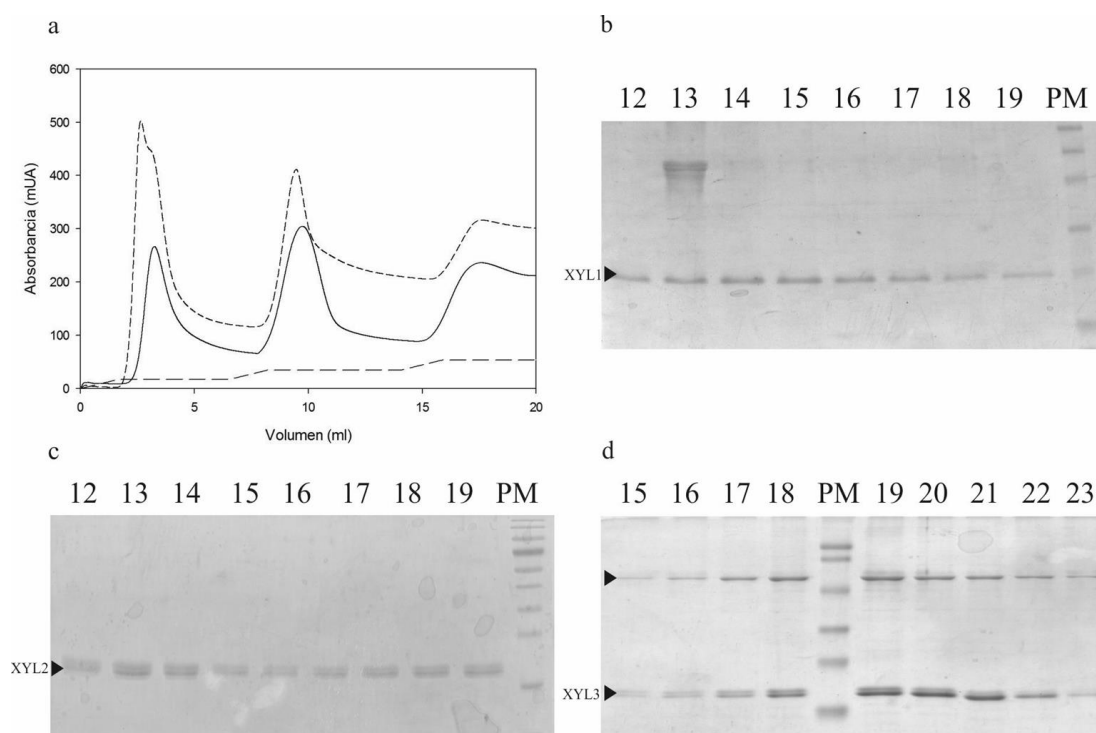
**Figura III-10 Detección por inmunotransferencia de los dominios CBM de ATXYN1.**

Los mismos fueron expresados en BL21/pLys mediante el vector pRSFDuet1. La composición resalta las bandas obtenidas para todos los dominios con sus correspondientes pesos moleculares. El marcador utilizado es el PageRuler™ de Thermo Fisher scientific®.

purificación mediante resinas de  $\text{Ni}^{2+}$ . Luego de la siembra, las proteínas de fusión se eluyeron en gradiente de buffer B (imidazol 1 M), observándose que la proteína ambas proteínas recombinantes (XYL1 y XYL2) eluyeron a una a una concentración de imidazol de aproximadamente 98 mM para XYL1 y para XYL2 (28% buffer B) (Figura III-11a).

A continuación, todas las alícuotas de las distintas etapas de la purificación fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes para evaluar la eficiencia de la purificación y determinar las fracciones que presentaban la proteína de interés (Figura III-11b, c y d). En distintas fracciones, especialmente en la purificación de XYL3, se observó la presencia de una banda que corresponde a una chaperonina endógena de *E. coli*. La misma fue identificada en nuestro laboratorio por espectroscopia de masa. De todas formas, debido a las condiciones de purificación utilizadas en el laboratorio, hemos obtenido fracciones puras tanto de XYL1 como de XYL2.

Diferentes condiciones fueron utilizadas para almacenar las proteínas purificadas, incluyendo distintas concentraciones de glicerol, distintas temperaturas y distintas condiciones de liofilización. Si bien XYL2 presentaba una estabilidad mayor a XYL1, ambas proteínas se almacenaron de forma satisfactoria a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , con una concentración de glicerol del 20%.



**Figura III-11 Purificación por afinidad de los dominios CBM individuales de ATXYN1.**

a) Cromatograma obtenido con el purificador ÄKTA de los dominios XYL1 (guion pequeño) y XYL2 (línea continua). El valor del gradiente (porcentaje buffer B) a lo largo de la purificación, está representado con la línea cortada (guion largo). SDS-PAGE de fracciones seleccionadas, obtenidas para XYL1 (b), XYL2 (c) y XYL3 (d). En los tres casos se resaltan con una flecha la presencia de la proteína esperada.

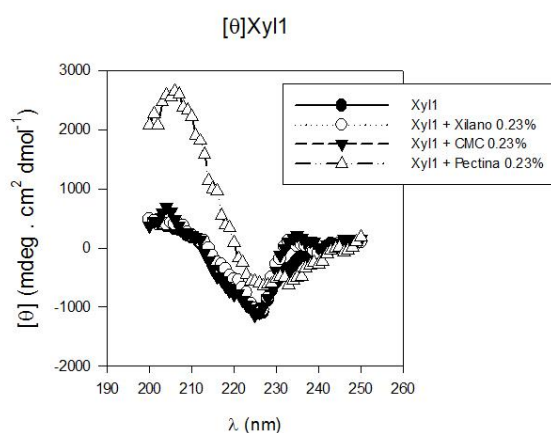
En el caso de XYL3, las condiciones de purificación ensayadas no nos permitieron obtener la proteína pura y soluble al mismo tiempo. Debido a que la presencia de bandas contaminantes y una inmediata precipitación de la proteína ocurrían después de los distintos enfoques de purificación en estado nativo, se decidió a implementar una purificación en estado desnaturalizado con Urea 8M (ver materiales y métodos). Las fracciones de la proteína recombinante fueron sometidas a concentración en tubos Amicon Ultra-15 (Millipore) en buffer fosfato 50 mM, pH 7.5, con el objetivo de eliminar sales (Imidazol y/o Urea), altamente interferente en las medidas espectrométricas realizadas a continuación. Este método fue realizado suavemente, con el objetivo de disminuir lentamente la concentración de urea y lograr un replegado correcto de la proteína XYL3.

### Evaluación de propiedades bioquímicas y espectrofotométrica del dominio Xyl1

#### Evaluación del espectro de Dicroísmo Circular de XYL1 en presencia y ausencia de distintos ligandos

El Dicroísmo Circular (CD) es usado para analizar las estructuras secundarias de proteínas en solución. Se basa en la dependencia de la actividad óptica de las proteínas en el rango de longitud de ondas entre 170-240 nm, con la orientación del esqueleto de los enlaces peptídicos, y en menor medida con las cadenas laterales (Perez-Iratxeta y Andrade-Navarro, 2008). Diferentes tipos de estructuras secundarias producen espectros característicos, y el espectro dado por una proteína puede ser usado para estimar el contenido porcentual del tipo de estructura secundaria mayoritaria. A partir de los resultados obtenidos, decidimos evaluar el comportamiento del espectro de dicroísmo circular de la proteína pura (5  $\mu\text{M}$ ) y en presencia de cantidades fijas (0,2%) de distintos carbohidratos (xilano, pectina y carboximetilcelulosa) en buffer mM Tris-HCl, pH 7,4. Los espectros mostrados en la Figura III-12 muestran la elipticidad residual ( $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ ) obtenida al sustraer la línea de base.

De esta manera, observamos el espectro perteneciente a XYL1 pura y en presencia de distintos ligandos. La preparación de las soluciones de los mismos se encuentra descrita en materiales y métodos. Es importante aclarar que el trabajo con estos sustratos se dificulta en la medida que es imposible encontrar un valor de peso molecular standard para los distintos sustratos, además de la baja solubilidad de los mismos, especialmente en el caso de la celulosa. De esta manera, hemos decidido utilizar como sustrato la carboximetilcelulosa (CMC), un polímero lineal con propiedades similares a la celulosa, pero con una mayor solubilidad. En todos los casos se



**Figura III-12 Espectros de Dicroísmo Circular de XYL1.**

Los mismos fueron determinados en ausencia y en presencia de polisacáridos de pared. La elipticidad molar mostrada fue calculada sustrayendo la línea base en ausencia de proteínas y polisacáridos. Los polisacáridos no presentan un espectro de DC significativo en ausencia de proteínas (no mostrado).

Condición	XYL1		
	$\alpha$ -hélice (%)	$\beta$ -lámina (%)	$\beta$ -lámina (modelo) (%)
Proteína pura	0.78	44.08	50.7
XYL + Xilano 0.2%	0.79	44.14	-
XYL + CMC 0.2%	0.78	44.08	-

**Tabla III-7 Porcentaje de estructura secundaria obtenida para el dominio XYL1.**

Los espectros fueron obtenidos en ausencia y en presencia de polisacáridos, y analizados con el programa K2D3, mientras que el contenido de  $\beta$ -lámina de los modelos, fue obtenido con el programa PDBsum.

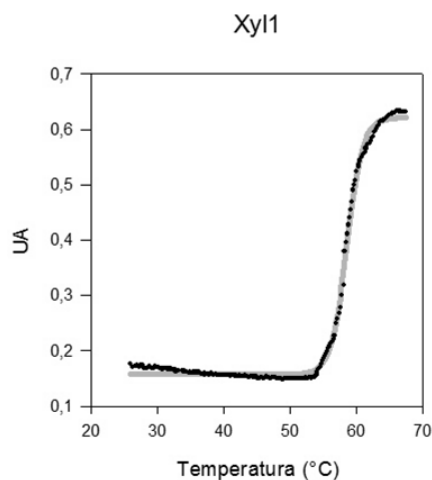
preparó soluciones madres de 1% P/V, utilizándose los volúmenes apropiados para cada ensayo.

En el caso de la proteína pura, con xilano y con CMC se evidencia claramente un espectro característico de una proteína con un plegamiento de lámina  $\beta$  dominante. En cambio el espectro de la proteína en presencia de pectina presenta cambios relevantes. Si bien en un principio esto sugirió algún problema técnico considerando que la línea de base realizada con pectina 0,2% no mostró un espectro específico, un análisis posterior nos indicó que este espectro con elipticidad positiva se debía a la gelificación de la pectina en presencia de cationes divalentes, posiblemente contenidos en la muestra proteica (Braccini y Pérez, 2001).

Estos espectros han sido analizados mediante el programa K2D3 (Louis-Jeune, y col., 2012) y el porcentaje de estructura secundaria se muestra en la Tabla III-7, 8 y 9. Adicionalmente, los modelos obtenidos anteriormente, fueron analizados mediante el programa PDBsum (Laskowski, y col., 1997; de Beer, y col., 2014) específicamente con el programa Promotif (Hutchinson y Thornton, 1996). En el caso de XYL1 (Tabla III-7), se observa un porcentaje de estructura secundaria de aproximadamente 44.1%, basados en el espectro de DC, mientras que el porcentaje obtenido a partir del modelado es del 50.7%. De esta forma, podemos concluir que posteriormente al proceso de purificación, la proteína se presenta en un estado soluble y plegado correctamente, al menos en el orden de estructura secundaria.

### Estimación de la temperatura de desnaturalización de XYL1

El mecanismo de acción de los CBM depende de la proteína en la que se encuentran asociados. En algunos casos, se ha asociado la presencia de los mismo con un incremento de la estabilidad de las proteínas en solución, específicamente en condiciones de altas temperaturas (Charnock, y col., 2000). De esta manera, para continuar la caracterización fisicoquímica de los dominios de



**Figura III-13 Curva de desnaturalización de XYL1 en función de la temperatura.**

El seguimiento del desplegamiento proteico fue llevado a cabo determinando la absorbancia de residuos aromáticos expuestos al solvente (círculos negros). La curva obtenida por regresión no lineal se encuentra graficada como una línea continua.

manera independiente y con el objetivo de encontrar posibles diferencias en la funcionalidad de los mismos que justifiquen la presencia de tres CBM en tándem, determinamos la temperatura de desnaturalización de XYL1, siguiendo el protocolo en la sección correspondiente de materiales y métodos. En la Figura III-13, se grafica la diferencia de absorción de los 13 residuos aromáticos que presenta XYL1 ( $\lambda = 293$  nm) entre una temperatura variable (Abs) y la absorción de los mismos a una temperatura inicial ( $T_0$ ). De esta manera, a medida que la proteína se despliega los aminoácidos aromáticos se exponen al solvente aumentando la absorción total. Posteriormente, los puntos fueron sometidos a una regresión no lineal (sigmoidea de 4 parámetros:  $f = y_0 + a/(1 + \exp(-(x-x_0)/b))$ ), encontrando el valor de la temperatura de desnaturalización  $T_m$  ( $x_0$ ), de 53.4 (p-value < 0.0001), un valor de R de 0,9989, y una p asociada a la regresión de < 0.0001.

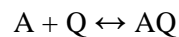
### **Estudios espectrofluorométricos del dominio XYL1 en ausencia y en presencia de distintos ligandos**

La fluorescencia del triptófano es ampliamente usada como una herramienta para monitorear cambios en las proteínas y para generar inferencias en las dinámicas y estructuras locales. Ésta es sensible a la polaridad de su entorno y es un excelente candidato para ser utilizado como sonda en diversas proteínas, ya que se pueden explotar los cambios en la intensidad de la fluorescencia, en la longitud de onda máxima de emisión ( $\lambda_{\text{máx}}$ ), en la forma de la banda, anisotropía, tiempo de vida de la fluorescencia y en la transferencia de energía. Asimismo, son aplicadas para seguir el plegamiento de una proteína, la unión de un sustrato y la accesibilidad a

un desactivador de fluorescencia (“quencher”) externo, entre otros fenómenos (Vivian y Callis, 2001).

De esta manera, nos hemos utilizado la fluorescencia de los Trp en función de la presencia de posibles ligandos naturales que pueda encontrar la proteína en la pared celular, específicamente xilano, celulosa y pectina, aprovechando la presencia de los aminoácidos aromáticos en el sitio de unión putativo de los miembros de la familia CAZy 22. Específicamente el Trp ubicado en la posición 1, presente en los tres dominios XYL y un Trp ubicado en la posición 2 de XYL3 (ver Figura III-7a). El sitio putativo de unión a ligandos de XYL1 está compuesto por los siguientes residuos: Trp82, Tyr132 y Tyr164. De todas maneras, es importante aclarar que los tres dominios presentan Trp no ubicados en el sitio consenso, los cuales pueden estar expuestos o no al solvente o interaccionar (o no) con los sustratos. De esta forma, XYL1 presenta un total de 3 triptófanos, XYL2 presenta 4 triptófanos y XYL3 presenta 5 triptófanos.

Asimismo, determinamos los valores de fluorescencia en presencia de distintas concentraciones de ligandos ( $F'$ ) y fue graficada en comparación de la fluorescencia inicial en ausencia de los mismos ( $F_0$ ). Los valores obtenidos se encuentran graficados en la Figura III-14 a en función de la concentración de sustrato (% P/V). Los puntos fueron ajustados mediante una regresión linear, en la cual el valor de la pendiente indica el “grado de interacción física” entre los polisacáridos y los Trp de los diferentes dominios. Este método se basa en los gráficos de Stern-Volmer, en los cuales se varía la concentración de un “quencher” y se obtiene una disminución en la intensidad de fluorescencia. Debido que en estos casos se está estudiando la posible unión de ligandos con una proteína, consideramos que la extinción de fluorescencia observada se debe a “quenching estático” debido a que la formación del complejo no exhibe fluorescencia. Este tipo de quenching es descrito como una recta cuando se grafica  $F'/F_0$ , en la cual la pendiente de la misma es la constante de asociación del complejo  $K_a$ :



$$K_a = \frac{[AQ]}{[A][Q]}$$

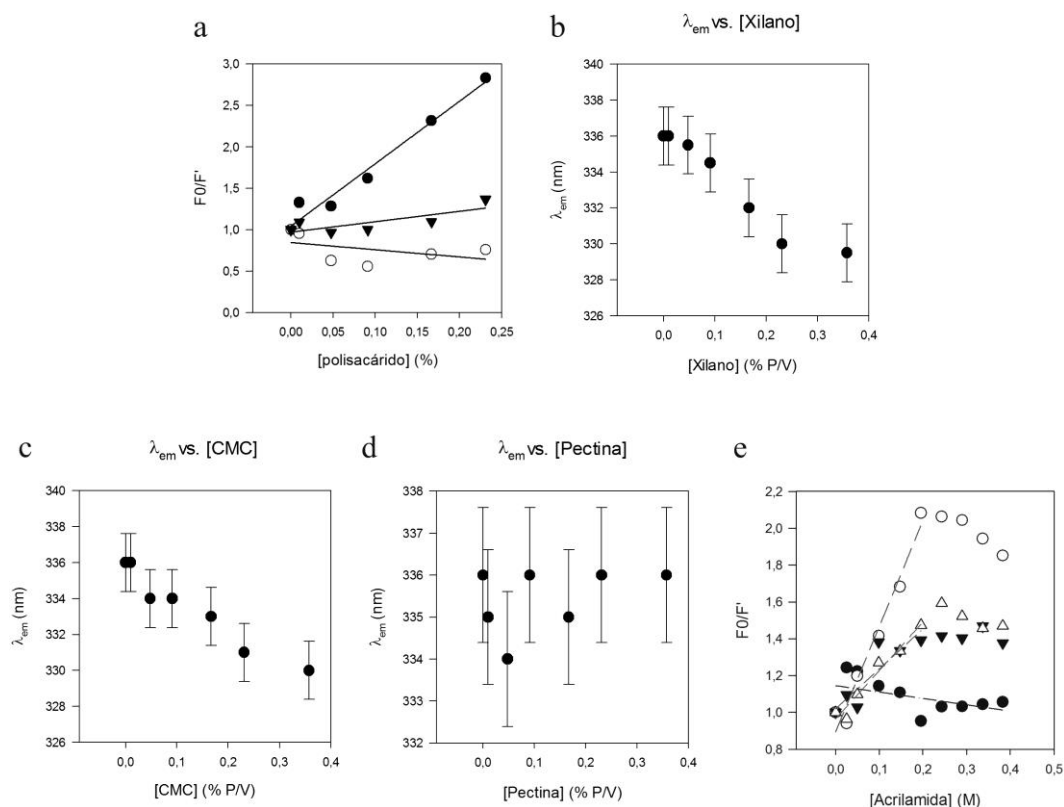
$$\frac{F'}{F_0} = 1 + K_a [Q]$$

De esta manera, podemos observar en la Figura III-14 a que existe una significativa disminución de  $F'$  en presencia de cantidades crecientes de xilano y pectina, pero no en presencia de CMC.



Así, calculando las  $K_a$ , observamos que la formación del complejo se encuentra favorecida en el caso del complejo Trp-xilano, con una constante de asociación de  $7.6 \pm 0.3 \%^{-1}$  en comparación de la constante Trp-pectina,  $1.3 \pm 0.2 \%^{-1}$ .

El máximo de emisión es particularmente sensible al ambiente local, variando desde 308 nm a 355 nm, y se correlaciona aproximadamente con el grado de exposición al solvente. Normalmente, la presencia de un entorno más hidrofílico (como por ejemplo, producto de una mayor exposición al solvente) produce un cambio de  $\lambda_{\text{máx}}$  a valores más grandes (corrimiento al rojo). Es se produce especialmente en solventes con altas constantes dieléctricas (como el agua), la cual genera un campo eléctrico estático capaz de desplazar y desdoblar las líneas espectrales



**Figura III-14 Estudios Espectrofluorométricos del dominio XYL1 de ATXN1 de *A. thaliana*.**

a) Fluorescencia relativa de los Trp en ausencia ( $F_0$ ) y en presencia ( $F'$ ) de distintas cantidades de xilano (círculo negro), pectina (triángulo) y CMC (círculo blanco). La regresión lineal para cada subgrupo de datos, está representada con una recta. Variaciones de los máximos de emisión observados en los espectros obtenidos a distintas concentraciones de xilano (b), CMC (c) y pectina (d). Por último, se observa los gráficos de Stern-Volmer de extinción de la fluorescencia a distintas concentraciones de acrilamida para XYL1 (e), ajustada mediante una regresión lineal. XYL1 (círculo negro); XYL1 + xilano 0.23% (círculo blanco); XYL1 + pectina 0.23% (triángulo negro) y XYL1 + CMC 0.23% (triángulo blanco)

de los átomos y moléculas, conocido como Efecto Stark interno (Vivian y Callis, 2001). Cuando el fluoróforo se encuentra en un entorno más hidrofóbico ocurre lo contrario, provocando un cambio en la  $\lambda_{\text{máx}}$  a valores más pequeños (corrimiento al azul).

En la Figura III-14 b, c y d, se puede observar que tanto la unión de xilano y, sorprendentemente, CMC a XYL1 desplaza la  $\lambda_{\text{máx}}$  de 336 a 330. Sin embargo, esto no ocurre en la unión de pectina. Una posible explicación podría atribuirse a las características químicas de los distintos polisacáridos. Los polisacáridos neutros como CMC o xilano, son capaces de generar un entorno más hidrofóbico en el sitio de unión de XYL1 provocando un corrimiento al azul. Debido a las propiedades ácidas de la pectina, es probable que la hidrofobicidad de la misma no sea suficiente para generar un corrimiento apreciable en la  $\lambda_{\text{máx}}$ .

Debido a que XYL1 presenta 3 residuos de Trp, y solo uno se encuentra asociado al sitio de unión putativo, decidimos evaluar la exposición de los mismos mediante un ensayo de extinción controlada de fluorescencia, con el uso de concentraciones crecientes de un quencher dinámico reconocido (acrilamida) en presencia y ausencia de distintos ligandos. En la Figura III-14 e, podemos observar que en ausencia de ligandos, XYL1 no presenta residuos de Trp expuestos al solvente evidenciados por un  $K_{\text{sv}} \approx 0$ . Sin embargo, en presencia de 0.23% de xilano se observa una gráfica de Stern-Volmer lineal hasta una concentración de acrilamida de 0.2 M, y a partir de aquí se observa una meseta. Algo similar ocurre en presencia de CMC y de pectina, pero con una  $K_{\text{sv}}$  menores ( $2.6 \text{ M}^{-1}$  y  $1.1 \text{ M}^{-1}$ , respectivamente) lo cual indicaría que ante la presencia de estos ligandos existiría una menor exposición de Trp al solvente.

En ausencia de ligandos, XYL1 no presentaría residuos de Trp expuestos generando una recta con pendiente = 0. Sin embargo, en presencia de un ligandos se observa la clásica curva cóncava no lineal de Stern-Volmer, la cual generalmente se explica por la presencia de dos poblaciones de fluoróforos, una accesible al solvente y la otra no (Eftink y Ghiron, 1981; Quioco, 1988). Si estos residuos pertenecen o no al sitio de unión, no puede determinarse mediante este enfoque. Esto, además, sugiere un cambio conformacional de la proteína en presencia de ligandos específicos.

Otra posible explicación es que a estas concentraciones de polisacáridos, no toda la población de XYL1 se encuentre unida a los ligandos y exista una fracción de la población no unida, conservando todos sus Trp expuestos, aunque esto no debería ser el caso teniendo en cuenta las concentraciones de polisacáridos utilizadas. De todas maneras, la exposición producida por

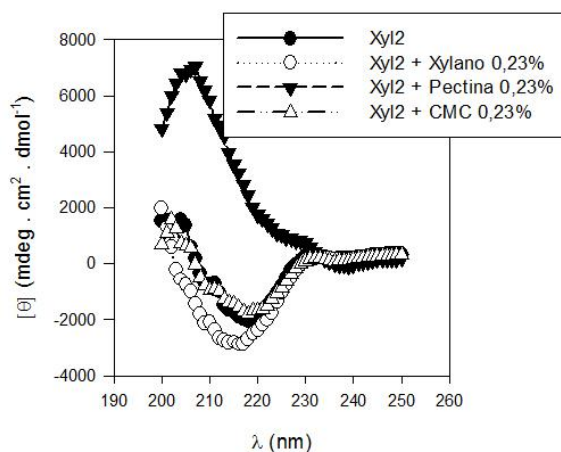
xilano es mayor que con el resto de los ligandos utilizados, sugiriendo una interacción más favorable.

Los resultados obtenidos hasta el momento, nos permiten concluir que probablemente el surco superficial de XYL1, que ubica los residuos conservados para la unión de polisacáridos, puede albergar los tres ligandos ensayados, aunque con distintas propiedades. Tanto el xilano como la pectina serían capaces de generar un complejo no fluorescente con Trp (especulativamente, con el Trp del sitio de unión), aunque el primer ligando se asocia mucho más fuertemente que el segundo. Por otro lado, el xilano y la CMC son capaces de generar un entorno lo suficientemente hidrofóbico, como para generar un desplazamiento al azul de la  $\lambda_{\text{máx}}$  de emisión. Esto no ocurre con la pectina. Por último, podemos observar que los tres ligandos son capaces de exponer una población de residuos de Trp y proteger una segunda.

### Evaluación de propiedades bioquímicas y espectrofotométrica del dominio XYL2

#### Evaluación del espectro de Dicroísmo Circular de XYL2 en presencia y ausencia de distintos ligandos

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para XYL1, procedimos a realizar el mismo método de análisis para XYL2. De esta manera, en la Figura III-15, observamos un comportamiento diferencial de este dominio en presencia de los distintos polisacáridos evaluados. Por un lado, observamos que el espectro de la proteína pura no difiere



**Figura III-15 Espectros de Dicroísmo Circular de XYL2.**

Los mismos fueron determinados en ausencia y en presencia de polisacáridos de pared. La elipticidad molar mostrada fue calculada sustrayendo la línea base en ausencia de proteínas y polisacáridos. Los polisacáridos no presentan un espectro de DC significativo en ausencia de proteínas (no mostrado).

significativamente con el espectro obtenido en presencia de CMC 0.2%. Sin embargo, en

Condición	XYL2		
	$\alpha$ -hélice (%)	$\beta$ -lámina (%)	$\beta$ -lámina (modelo) (%)
<b>Proteína pura</b>	0.69	44.4	43.6
<b>XYL + Xilano 0.2%</b>	1.32	43.36	-
<b>XYL + CMC 0.2%</b>	0.85	44.16	-

**Tabla III-8 Porcentaje de estructura secundaria obtenida para el dominio XYL2.**

Los espectros fueron obtenidos en ausencia y en presencia de polisacáridos, y analizados con el programa K2D3, mientras que el contenido de  $\beta$ -lámina de los modelos, fue obtenido con el programa PDBsum.

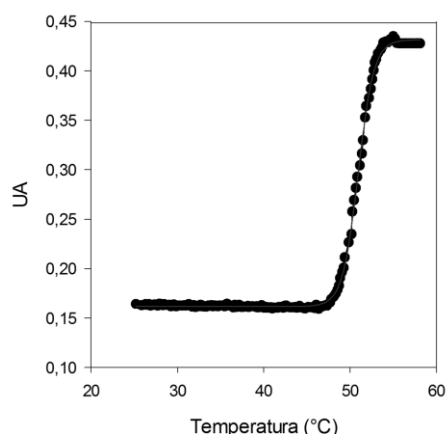
presencia de xilano se produjo una alteración apreciable en el espectro de CD, sugiriendo un cambio estructural. Nuevamente obtuvimos un espectro con elipticidad positiva en presencia de pectina, correspondiente a la gelificación de la misma. Por último, a partir de estos resultados, determinamos el porcentaje de estructura secundaria a partir de los datos del espectro de CD, usando el algoritmo K2d3. El contenido de  $\alpha$ -hélice, lámina- $\beta$  del dominio XYL2 fue de 0.69% y 44.4% respectivamente. Esto concuerda con los porcentajes obtenidos en el modelo de la misma (43.6% lámina- $\beta$ ) (Tabla III-8).

### Estimación de la temperatura de desnaturalización de XYL2

XYL2 presenta doce residuos aromáticos capaces de absorber a 293 nm, según el grado de exposición de los mismos. Siguiendo la misma línea de caracterización que utilizamos para XYL1 determinamos que la temperatura de desnaturalización de XYL2 es de 50.9°C. La regresión no lineal (sigmoidea) utilizada presento una p asociada <0.0001 y un R de 1.000 (Figura III-16). De esta manera, podemos observar que la estabilidad térmica de XYL2 es menor que la de XYL1 (50.9 °C y 53.4 °C, respectivamente).

### Estudios espectrofluorométricos del dominio XYL2 en ausencia y en presencia de distintos ligandos

Para evaluar la posible unión del sustrato a través de los residuos putativos (Trp248, Tyr298 y Val328), y dado que XYL2 presenta cuatro residuos de Trp, y que uno de ellos estaría



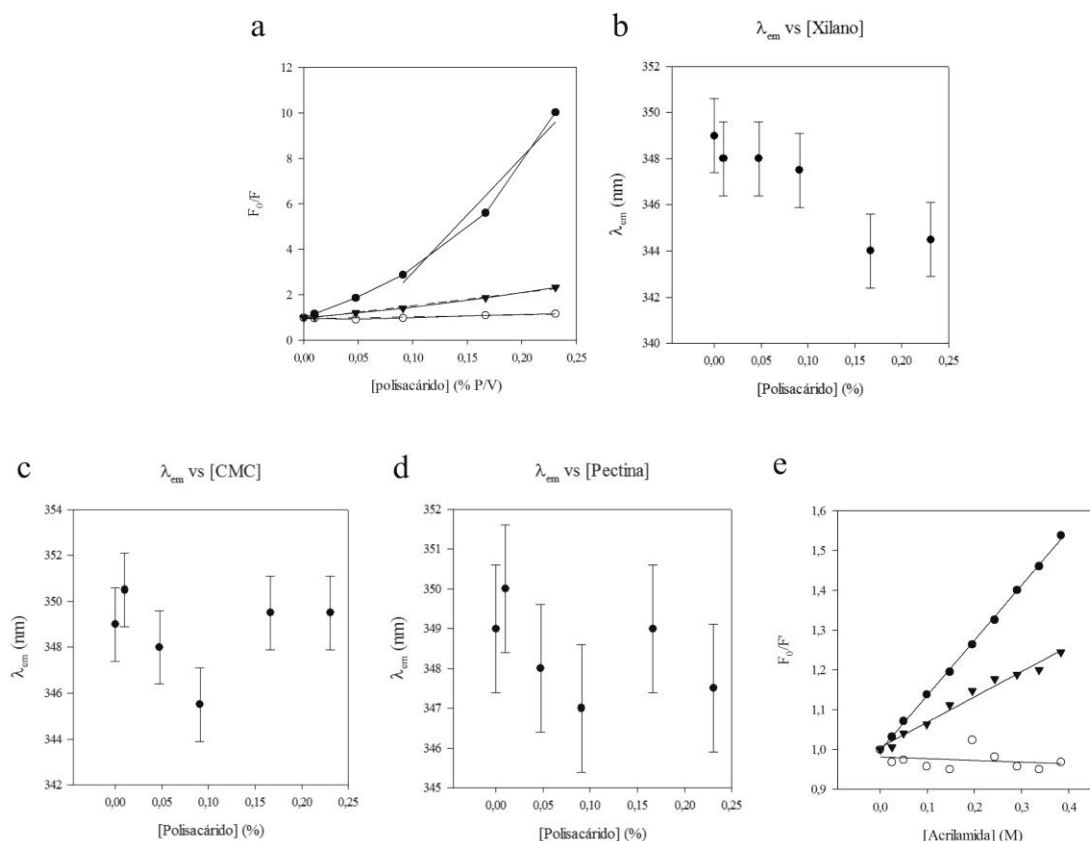
**Figura III-16 Curva de desnaturalización de AtXYL2 en función de la temperatura.**

El seguimiento del desplegado proteico fue llevado a cabo determinando la absorbancia de residuos aromáticos expuestos al solvente (círculos negros). La curva obtenida por regresión no lineal se encuentra graficada como una línea continua.

involucrado en la unión al sustrato, decidimos determinar las propiedades espectrofluorométricas de XYL2.

En la Figura III-17a, podemos observar la relación de la intensidad de fluorescencia de XYL2 en presencia de distintas concentraciones de polisacáridos de pared ( $F'$ ), relativizada a la intensidad en ausencia de los mismos  $F_0$ . A partir de ella concluimos que existe una extinción de la fluorescencia de los triptófanos de XYL2 en presencia de xilano. También existe una disminución significativa de  $F'$  en presencia de pectina pero no en presencia de CMC. Llamativamente, para el gráfico  $F'/F_0$  vs [xilano] presenta una curvatura positiva. Normalmente esto se observa cuando ocurre simultáneamente una extinción de fluorescencia dinámica y estática, en la que la relación  $F'/F_0$  se vuelve proporcional a la concentración de xilano al cuadrado ( $[\text{xilano}]^2$ ) (Behera, y col., 1995). El valor de esta constante para el complejo Trp-pectina fue  $5.7 \%^{-1} \pm 0.3 \%^{-1}$ , mientras que el valor para el complejo Trp-CMC fue de  $0.9 \%^{-1} \pm 0.2 \%^{-1}$ . Sin embargo, es imposible calcular con precisión el valor de  $K_a$  debido a la curvatura positiva de la gráfica de Stern-Volmer de XYL2 en presencia de xilano. De todas maneras, es comúnmente aceptado que cuando existe la contribución de mecanismos dinámicos y estáticos a la extinción de la fluorescencia, ésta se ve mayormente afectada a mayor concentración del extintor (Keizer, 1983). Debido a esto, la mejor aproximación al valor  $K_a$  puede calcularse utilizando la región de mayor concentración de xilano que arroja un valor de  $50.6 \%^{-1} \pm 9.4 \%^{-1}$ .

Por otro lado, observamos en la Figura III-17b un corrimiento al azul de los picos de emisión de XYL2 en presencia de xilano (de 349 nm a 344.5 nm) pero no en presencia de pectina y CMC



**Figura III-17 Estudios Espectrofluorométricos del dominio XYL2 de ATXYN1 de *A. thaliana*.**

a) Fluorescencia relativa de los Trp en ausencia ( $F_0$ ) y en presencia ( $F'$ ) de distintas cantidades de xilano (círculo negro), pectina (triángulo) y CMC (círculo blanco). La regresión lineal para cada subgrupo de datos, está representada con una recta. Variaciones de los máximos de emisión observados en los espectros obtenidos a distintas concentraciones de xilano (b), CMC (c) y pectina (d). Por último, se observa los gráficos de Stern-Volmer de extinción de la fluorescencia a distintas concentraciones de acrilamida para XYL1 (e), ajustada mediante una regresión lineal. XYL2 (círculo negro); XYL2 + xilano 0.23% (círculo blanco); XYL2 + pectina 0.23% (triángulo negro).

(Figura III-17 c y d). Esto nos indicó que el entorno del Trp asociado al sitio de unión se tornó más hidrofóbico por interacción con xilano pero no con el resto de los ligandos.

A partir de esto, decidimos evaluar el comportamiento de este dominio frente a un extintor como acrilamida, en ausencia y en presencia de xilano, pectina y CMC. En primer lugar, en la Figura III-17e se puede observar que los residuos de Trp se encuentran expuestos en XYL2 pura, a diferencia de lo que ocurre con XYL1, obteniéndose una  $K_{sv} = 1.4 \text{ M}^{-1} \pm 0.2 \text{ M}^{-1}$ . Además, en presencia de pectina y CMC también se produce una extinción de fluorescencia pero con valor de  $K_{sv}$  significativamente menor ( $0.7 \text{ M}^{-1} \pm 0.2 \text{ M}^{-1}$  y  $0.2 \text{ M}^{-1} \pm 0.1 \text{ M}^{-1}$ , respectivamente). Sin embargo, la presencia de xilano es capaz de proteger la fluorescencia

residual en presencia de acrilamida. Si bien no resulta verosímil considerar que el xilano protege todos los residuos de Trp, consideramos que a la concentración de xilano utilizada (0.23% P/V) los residuos no asociados a la unión fueron desactivados por la acción de extinción dinámica complementaria observada en la Figura III-17 a.

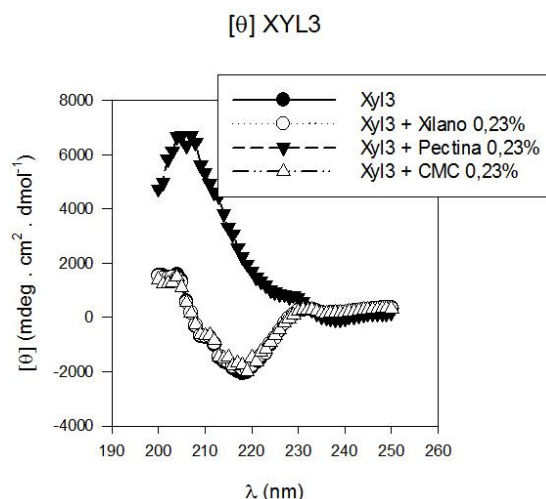
De esta forma, podemos especular, que en XYL1, no se exponen al solvente todos los residuos de Trp en presencia de los ligandos y que en caso de XYL2, todos los residuos se encuentran expuestos y sólo el residuo involucrado en la unión con xilano se encuentra protegido. Asimismo, podemos considerar que el dominio XYL2 se caracteriza principalmente por una gran afinidad a xilano y en menor medida con pectina. Sin embargo, debido a que no encontramos evidencias adicionales de una interacción específica de pectina con el sitio de unión ( $\lambda_{\text{máx}}$  o protección frente a acrilamida), no podemos descartar que la reducción de la fluorescencia observada en presencia de pectina se deba a una desactivación dinámica mediada por el mismo ligando. La contribución de la desactivación dinámica mediada por xilano apoya esta última explicación, pero la ausencia de extinción en presencia de CMC se opone a la misma.

### **Evaluación de propiedades bioquímicas y espectrofotométrica del dominio XYL3**

#### **Evaluación del espectro de Dicroísmo Circular de XYL3 en presencia y ausencia de distintos ligandos**

La evaluación de la estructura secundaria de la proteína recombinante XYL3 es sumamente importante debido a que el método de purificación utilizado implicaba procesos de desnaturalización y renaturalización de la proteína. El espectro de DC de la proteína desalada puede observarse en la Figura III-18. Para estimar la composición de la estructura secundaria, los datos obtenidos se analizaron usando el algoritmo K2D3 (Andrade, y col., 1993). Los contenidos de  $\alpha$ -hélices y láminas- $\beta$  fueron 0.95 y 44.37 % respectivamente (Tabla III-9), resultando similares a los predichos a partir del modelo 3-D (0%  $\alpha$ -hélices, 41.8% de láminas- $\beta$ ). Esto nos permite corroborar que posteriormente al paso de replegado la proteína adquiere una estructura secundaria similar a la esperada por el análisis *in silico*.

De esta manera, evaluamos el espectro de esta proteína en presencia de los tres ligandos estudiados hasta el momento. Como puede observarse en la Figura III-18, tanto en presencia de xilano como CMC, el espectro presenta el mismo comportamiento que en ausencia de los mismos. Esto nos sugiere que, en principio, no habría evidencias para suponer una interacción



**Figura III-18 Espectros de Dicroísmo Circular de XYL3.**

Los mismos fueron determinados en ausencia y en presencia de polisacáridos de pared. La elipticidad molar mostrada fue calculada sustrayendo la línea base en ausencia de proteínas y polisacáridos. Los polisacáridos no presentan un espectro de DC significativo en ausencia de proteínas (no mostrado).

proteína ligando. Además, puede observarse que en presencia de pectina, el espectro de DC presenta el mismo comportamiento asociado a la gelificación de la misma.

#### Estimación de la temperatura de desnaturalización y estudios espectrofluorométricos del dominio XYL3 en ausencia y en presencia de distintos ligandos

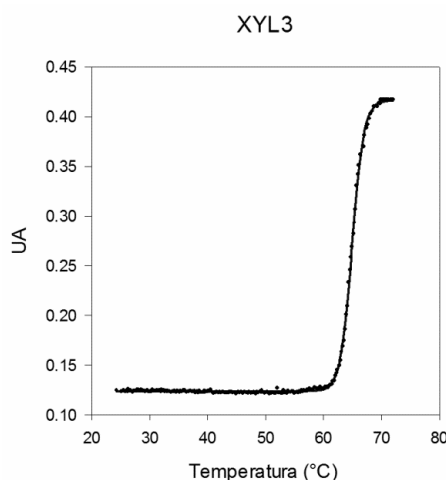
XYL3, al igual que XYL2, presenta doce residuos aromáticos capaces de absorber a 293 nm. Para evaluar una posible contribución a la estabilidad estructural de este dominio determinamos la temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) del mismo. De esta manera, el valor de  $T_m$  asociado a

Condición	XYL3		
	$\alpha$ -hélice (%)	$\beta$ -lámina (%)	$\beta$ -lámina (modelo) (%)
<b>Proteína pura</b>	0.95	44.37	41.8
<b>XYL + Xilano 0.2%</b>	0.95	44.42	-
<b>XYL + CMC 0.2%</b>	0.95	44.37	-

**Tabla III-9 Porcentaje de estructura secundaria obtenida para el dominio XYL3.**

Los espectros fueron obtenidos en ausencia y en presencia de polisacáridos, y analizados con el programa K2D3, mientras que el contenido de  $\beta$ -lámina de los modelos, fue obtenido con el programa PDBsum.





**Figura III-19 Curva de desnaturalización de XYL3 en función de la temperatura.**

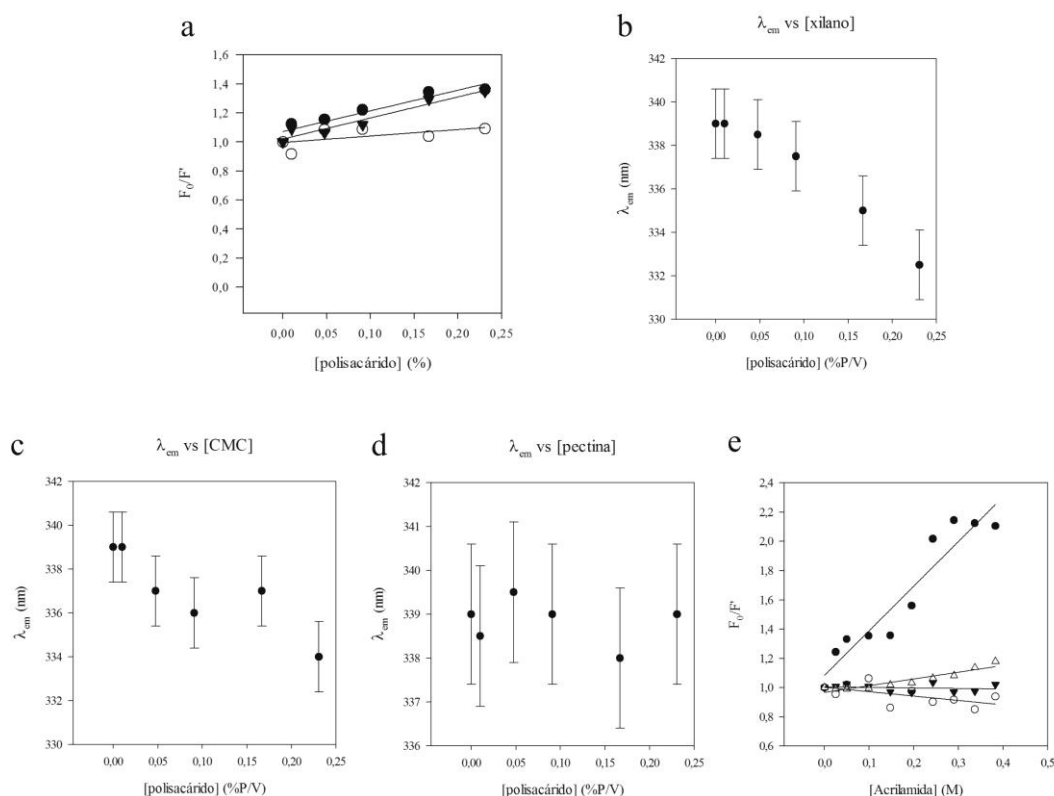
El seguimiento del desplegado proteico fue llevado a cabo determinando la absorbancia de residuos aromáticos expuestos al solvente (círculos negros). La curva obtenida por regresión no lineal se encuentra graficada como una línea continua.

XYL3 es de 64.9 °C, un valor significativamente mayor que el obtenido para XYL2 (50.9 °C) y para XYL1 (53.4 °C). La regresión utilizada presentó una  $p$  asociada  $<0,0001$  y un  $R$  de 0.9998 (Figura III-19).

El sitio de unión a polisacáridos de XYL3 está determinado por tres residuos putativos: Trp430, Trp475 y Tyr507. De esta manera, se procedió a evaluar la fluorescencia de XYL3 en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de los tres polisacáridos mayormente encontrados en la pared celular de *A. thaliana*. De esta manera, podemos observar en la Figura III-20 que tanto en presencia de xilano como pectina, existe una desactivación de la fluorescencia probablemente debido a un mecanismo de desactivación estática. Los valores de  $K_{ad}$  calculados para xilano y pectina son significativamente mayores a los encontrados para CMC ( $1.4 \%^{-1} \pm 0.2 \%^{-1}$  para xilano y pectina, y  $0.5 \%^{-1} \pm 0.3 \%^{-1}$  para CMC). Estos resultados, nos sugieren que existe una interacción entre este dominio y los polisacáridos xilano y pectina.

Al evaluar los corrimientos en las  $\lambda_{m\acute{a}x}$  encontramos que, de la misma manera que en XYL1, tanto la unión de xilano como CMC desplaza la  $\lambda_{m\acute{a}x}$  de 339 nm a 332 nm, en el primer caso, y de 339 nm a 334 nm en el segundo. Nuevamente, la unión a pectina no altera significativamente los valores de las  $\lambda_{m\acute{a}x}$ .

Para analizar la presencia de poblaciones de fluoróforos expuestas al solvente continuamos el análisis mediante la evaluación de la intensidad de la fluorescencia en presencia del



**Figura III-20 Estudios Espectrofluorométricos del dominio XYL3 de ATXYN1 de *A. thaliana*.**

a) Fluorescencia relativa de los Trp en ausencia ( $F_0$ ) y en presencia ( $F'$ ) de distintas cantidades de xilano (círculo negro), pectina (triángulo) y CMC (círculo blanco). La regresión lineal para cada subgrupo de datos, está representada con una recta. Variaciones de los máximos de emisión observados en los espectros obtenidos a distintas concentraciones de xilano (b), CMC (c) y pectina (d). Por último, se observa los gráficos de Stern-Volmer de extinción de la fluorescencia a distintas concentraciones de acrilamida para XYL3 (e), ajustada mediante una regresión lineal. XYL3 (círculo negro); XYL3 + xilano 0.23% (círculo blanco); XYL3 + pectina 0.23% (triángulo negro) y XYL3 + CMC 0.23% (triángulo blanco).

desactivador cinético acrilamida. En el caso de XYL3 pura se observa la presencia de dos desviaciones de la linealidad (mesetas) a medida que aumenta la concentración de acrilamida. Posiblemente esto se deba a la presencia de al menos tres poblaciones de Trp con distintos grados de exposición al solvente. La explicación a este comportamiento diferencial en comparación con los otros dos dominios (XYL1 y XYL2) probablemente esté asociada a la presencia de dos Trp en el sitio putativo de unión en XYL3 a diferencia del único Trp en la posición 1 encontrado en XYL1 y XYL2. Llamativamente la interacción con los tres ligandos produce una protección de todos los residuos de Trp (Figura III-20e).

De esta manera, encontramos que XYL3 no presenta una gran afinidad por los sustratos probados. Sin embargo, es capaz de interactuar con los mismos mediante residuos de Trp probablemente ubicados en el sitio activo. Es de destacar que estos estudios nos sugieren la presencia de tres posibles estados de exposición, los cuales pueden estar relacionados con la presencia de dos Trp ubicados en el sitio de unión putativo.

### **Efecto *in trans* de los dominios XYL1, XYL2 y XYL3 sobre la actividad xilanasa de una enzima comercial**

La degradación de residuos lignocelulósicos se encuentra en el foco de atención debido a las posibles aplicaciones en la industria energética. La degradación de los mismos se presenta como uno de los pasos limitantes para la obtención de productos económicamente rentables. Normalmente, la degradación de las hemicelulosas es un paso crucial en estos procesos además de la separación de la lignina impregnada en la pared secundaria de los sustratos utilizados. De esta manera, encontrar formas de aumentar la eficiencia catalítica de las enzimas utilizadas en estos procesos es un objetivo biotecnológico de gran importancia (Bhat, 2000).

Para hacer frente a esta extraordinaria complejidad, la naturaleza ha creado una gran variedad de enzimas que actúan sinérgicamente para descomponer la biomasa. Un interesante mecanismo molecular desarrollado por muchas hidrolasas de pared celular es la composición modular con dominios adicionales que incrementa la accesibilidad del dominio catalítico al sustrato. La mayoría de estos dominios adicionales son CBM (Sainz-Polo, y col., 2015).

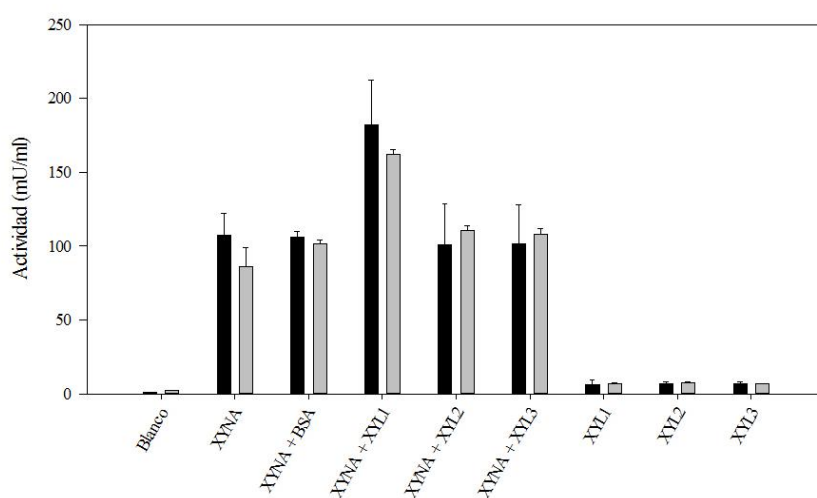
Como ya se ha comentado anteriormente, los mecanismos de acción de los CBM varían según la enzima en la que fueron evaluados. Pueden actuar acercando el dominio catalítico a los sustratos, pueden actuar como un armazón para la interacción proteína-proteína (Abbott y van Bueren, 2014) y, adicionalmente, pueden romper la estructura de los sustratos aumentando la eficiencia catalítica (Vaaje-Kolstad, y col., 2005). Este último caso es particularmente importante cuando los sustratos son estructurados, ya sea gránulos de almidón o pared celular de plantas.

Normalmente, se utilizan fusiones *in cis* (quimeras) para generar y evaluar construcciones como posibles herramientas biotecnológicas. Sin embargo, recientemente la quimera BsXYL11-CBM6 fue usada para la suplementación del coctel comercial Accellerase® 1500 aumentando un 17% la liberación de azúcares a partir de residuo pre-tratado de caña (Hoffmam, y col., 2016). Por otro lado, la interacción *in trans* de dominios SBD con el dominio catalítico de la SSIII de *Arabidopsis thaliana* fue demostrada previamente en nuestro laboratorio (Wayllace, y col.,

2010). Utilizando glucógeno como sustrato, se analizaron los parámetros cinéticos del dominio catalítico en ausencia y en presencia del dominio SBD123 *in trans*. En este caso se observó que la afinidad aparente ( $S_{0.5}$ ) entre el dominio catalítico (DC) y el sustrato fue recuperada a los valores obtenidos para la proteína completa en presencia del dominio SBD123. Además, el valor de este parámetro fue 5 veces mayor cuando se utilizó un el dominio SBD123 mutado en el Trp366 (W366A). Sin embargo, los valores de  $V_{max}$  sólo fueron reestablecidos parcialmente cuando se comparan los valores de este parámetro de la proteína SSIII entera y co-purificada. De esta forma, la utilización de estos dominios *in trans* aportarían versatilidad y velocidad de los ensayos de digestibilidad.

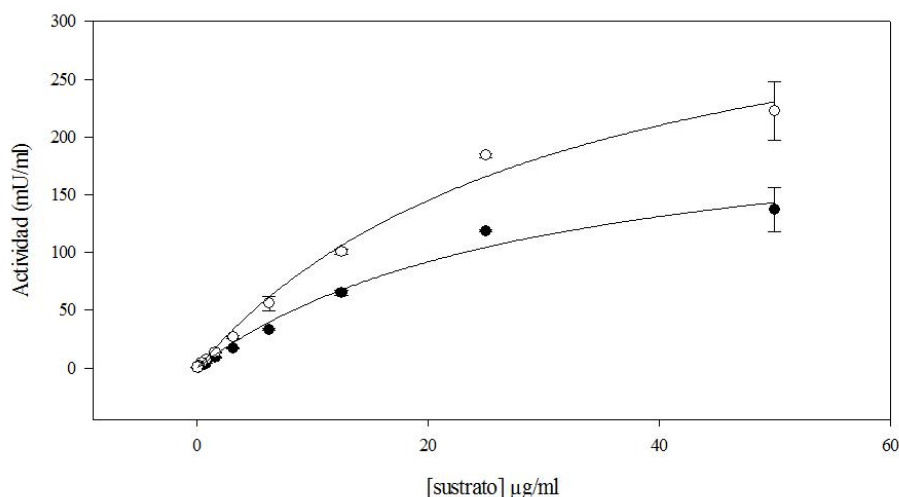
Normalmente la capacidad de un CBM de actuar *in trans* depende del mecanismo de acción del mismo en la proteína completa. Afortunadamente, ATXYN1 presenta tres dominios cuyas propiedades evaluadas hasta el momento los presentan como dominios con distintas peculiaridades que podrían estar aportando funciones distintas a la proteína completa.

La xilanasa de *Thermomyces lanuginosus* (XYNA), es una enzima comercial utilizada como referencia en la degradación de residuos lignocelulósicos. *Thermomyces lanuginosus* es un hongo aislado de sacos de yute en Bangladesh, y produce una xilanasa libre de celulasa



**Figura III-21 Actividad de la xilanasa XYNA de *Thermomyces lanuginosus*.**

La misma fue determinada en presencia y ausencia de los dominios CBM de ATXYN1. Los valores de actividad enzimática fueron obtenidos en ausencia y en presencia de XYL1, XYL2 y XYL3, en una proporción equimolar (10 µM; Negro), y en una proporción XYNA/CBM, 2 a 1 (10 µM / 5 µM; Gris). Adicionalmente se muestran los siguientes controles: Blanco de reacción, XYNA + BSA, y los dominios XYL1, XYL2 y XYL3, en ambas concentraciones.



**Figura III-22 Evaluación de los parámetros cinéticos de la xilanasa XYNA de *Thermomyces lanuginosus*.**

Los mismos fueron determinados en presencia y ausencia de XYL1. Los valores de actividad enzimática en presencia de XYL1, fueron obtenidos en una proporción XYNA/XYL1, 2 a 1 (10  $\mu$ M / 5  $\mu$ M; círculos blancos). Los puntos graficados fueron ajustados mediante una curva hiperbólica (Michaelis-Menten), y los parámetros de  $K_m$  y  $V_{max}$ , se muestran en el texto.

brindando la capacidad de utilizar biomasa lignocelulósica como sustrato de crecimiento (Gomes, y col., 1993). Esta proteína carece de CBM y presenta un dominio catalítico de la familia GH11. De esta manera, hemos diseñado ensayos de cuantificación de la actividad enzimática utilizando esta enzima en presencia y en ausencia de los dominios CBM de ATXYN1. Las determinaciones de la actividad enzimática fue llevada a cabo con el kit EnzChek® Ultra Xylanase Assay Kit (ThermoFisher Scientific) a 360 nm mediante un ensayo de fluorescencia en microplaca (Espectrofluorómetro Beckman Coulter DTX 880 Multimode Microplate Detector).

En la Figura III-21, podemos encontrar los valores de actividad xilanasas (mU/ml) en ausencia y en condiciones equimolares (10  $\mu$ M) con los distintos CBM de ATXYN1. Como puede observarse, de los tres CBM utilizados sólo XYL1 fue capaz de incrementar la  $V_{max}$  de XYNA un 69%. Por otro lado, la utilización de BSA en condiciones equimolares con XYNA no fue capaz de afectar la actividad de la enzima utilizada. Para evaluar la presencia de actividad degradativa de los CBM, la actividad xilanasas fue evaluada en los tres dominios en ausencia de XYNA. Estos resultados nos muestran que solo XYL1 es capaz de incrementar la  $V_{max}$  de XYNA. Para continuar la caracterización enzimática, hemos realizado los mismos ensayos con la mitad de concentración de CBM (5  $\mu$ M) en comparación con la concentración de XYNA (10

$\mu\text{M}$ ). Observamos que existe un incremento de un 88% de la  $V_{\max}$  de XYNA solo en presencia de XYL1 5  $\mu\text{M}$ . De esta forma, el efecto activador de XYL1 no parece responder a una relación estequiométrica de 1:1 con la enzima.

Considerando este resultado, evaluamos las propiedades cinéticas de XYNA en presencia y en ausencia de XYL1, variando la concentración del sustrato 6,8-difluoro-4-metilumbeliferil  $\beta$ -D-xilobiósido (Ge, y col., 2007). En la Figura III-22, se puede observar un significativo aumento de la  $V_{\max}$ , siendo de  $228.8 \pm 24.3$  mU/ml para XYNA y  $378.6 \pm 34.1$  mU/ml para XYNA + XYL1. Por último, se puede observar que no existe una diferencia significativa en los valores de  $K_m$ , para XYNA tanto en presencia ( $32.10 \pm 5.53$   $\mu\text{g/ml}$ ) como en ausencia de XYL1 ( $29.77 \pm 6.19$   $\mu\text{g/ml}$ ), sugiriendo que existe un aumento de la eficiencia catalítica de XYNA pero no en la afinidad de la misma por el sustrato.

### Discusión:

Estudios estructurales de miembros representativos de diversas familias de CBM han revelado los mecanismos de interacción y reconocimiento de los pares CBM-ligandos. En la actualidad, uno de los desafíos más grandes es representar los mecanismos moleculares asociados a las enzimas multi-modulares involucradas en la degradación de biomasa. Las enzimas que presentan estructuras modulares homogéneas han sido relacionadas normalmente con mecanismos de unión multivalentes y efectos de avidéz, mientras que los patrones heterogéneos se proponen como determinantes de la especificidad por diversos ligandos. Sin embargo, estudios previos han revelado que los CBM en *tándem* pueden presentar mecanismos funcionales más complejos (Abbott, y col., 2008), sugiriendo que la aparente distinción entre arreglos homogéneos y heterogéneos puede no ser tan simple (Sainz-Polo, y col., 2015).

De esta forma, el diseño de modelos predictivos que usan la estructura primaria para dilucidar la especificidad de ligandos, están ayudando a desarrollar hipótesis e innovaciones para impulsar el uso de los CBM como herramientas biotecnológicas (Abbott y van Bueren, 2014). Las relaciones filogenéticas entre las secuencias de CBM puede ayudar a esclarecer la función de los mismos.

La caracterización de los dominios XYL de ATXYN1 de *A. thaliana* llevaron a la confirmación, tanto estructural por identidad de secuencia y por afinidad a su sustrato, como pertenecientes a la familia 22. Sin embargo, los tres residuos presentan características diferentes sugiriendo que la presencia de los tres dominios *in tándem*, permitirían aportar diversas funciones a la proteína

completa. Esto concuerda con lo encontrado para los dominios CBM1 y 2 de PbXYN10C-XBD, los cuales presentan diferentes características estructurales que generarían diferentes roles *in vivo* y explicando la necesidad de la multiplicidad de dominios de PbXYN10C (Sainz-Polo, y col., 2015).

Hace más de 50 años se propuso que en la degradación de la celulosa insoluble debían existir dos fases consecutivas. La primera, una fase no hidrolítica que garantice la accesibilidad del sustrato, seguida de una segunda fase de hidrólisis (Reese, y col., 1950). De esta forma, se ha demostrado que los CBM aislados de una celulasas pueden desestructurar la celulosa cristalina (Gao, y col., 2000). Además, Din y colaboradores (Din, y col., 1994) mostraron que los CBM de CENA, una endoglucanasa de *Cellulomonas fimi*, aumenta la disponibilidad del sustrato para el dominio catalítico mejorando la eficiencia de esta enzima. Por último, este fenómeno fue observado en la evaluación del efecto *in trans* de CBP21 (CBM de la familia 33) de *S. marcescens* el cual fue capaz de incrementar la eficiencia de quitinasa CHIG de *S. coelicolor* (Vaaje-Kolstad, y col., 2005).

Por otro lado, se observó que CBP21 no presenta Trp superficiales aunque si presenta una superficie en la cual residuos hidrofílicos se encuentran conservados. Por ello, debido a la posible similitud mecanística entre CBP21 y XYL1, es posible que la ausencia de Trp expuestos pueda explicar la ausencia de quenching dinámico de XYL1 en ausencia de ligando. Se observó también que la capacidad de desestructurar el sustrato por parte de CBP21 no es sensible a mutaciones individuales, lo que implicaría que la afinidad no sería importante en el mecanismo molecular de este dominio. Se creía que el mecanismo involucrado en la disrupción del sustrato estaba asociado al movimiento superficial de los CBM en la interfase cristalina del sustrato (como cuña) tal como fue descrito por Jervis y colaboradores (Jervis, y col., 1997) para los CBM asociados a celulasas como las de *Cellulomonas fimi*. Sin embargo, actualmente se sabe que CBP21 produce una reacción oxidativa que torna accesibles los extremos estructurados de la quitina, a través de residuos asociados al ion  $\text{Ca}^{+2}$ , postulando un modelo alternativo para la desestructuración del sustrato (Vaaje-Kolstad, y col., 2010).

Los resultados presentados en esta tesis sugieren que los tres dominios son capaces de colocar los sustratos ensayados en sus sitios de unión, aunque probablemente solo con xilano (y en menor medida pectina) se observa una interacción con los Trp asociados a la unión de sustratos. Así, se observó que XYL2 es el dominio con mayor afinidad a xilano, por lo que su función más probable puede estar asociada al direccionamiento de las enzimas a regiones específicas de los sustratos (Coutinho, y col., 1993), asistiendo a esas enzimas en la procesividad (Irwin, y col.,

1998). Esto concuerda con la presencia de todos los residuos funcionales en la misma posición que los observados en el miembro de la familia CBM22 utilizado como molde. Además, XYL3 presenta el Trp475 en lugar de la Tyr conservada en la posición 2, y no posee los residuos críticos Arg y Glu, los cuales están presentes en XYL2. Por último, XYL1, presenta la configuración predicha de todos sus residuos, excepto porque la Arg se encuentra remplazada por una Asp en la posición 46. Esto explica, al menos parcialmente, los valores de afinidad presentados por los diferentes dominios por el xilano. Así, si bien XYL1 no exhibe una afinidad elevada por los sustratos evaluados, se observó que es el único dominio capaz de afectar la actividad xilanasa del modelo XYNA de *Thermomyces lanuginosus*. De esta manera, se puede pensar que la contribución de este dominio a la actividad de la proteína completa puede estar asociada a la capacidad de disrupción no catalítica del sustrato (Vaaje-Kolstad, y col., 2010).

Además, la contribución de XYL3 aún no está clara ya que este dominio no presenta una afinidad marcada por ninguno de los ligandos ensayados (como XYL2) ni es capaz de afectar la actividad de enzimas *in trans* (como XYL1). Sin embargo, XYL3 se ha caracterizado por mostrar una mayor temperatura de “melting” en comparación a los otros dos dominios. Posiblemente, la contribución de XYL3 a la proteína ATXYN1 esté dada mayoritariamente a nivel estructural que a nivel mecánico. Estudios complementarios deben ser llevados a cabo para confirmar la contribución real de este dominio, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Por último, la asociación de los CBM con los DC puede revelar un rol integrador entre módulos. Por ejemplo, las regiones inter-dominio que carecen de estructura secundaria pueden ubicar a los sitios de unión de los CBM en la posición correcta para interactuar con los DC (u otros CBM). Esta flexibilidad puede ser especialmente importante en entornos complejos, como la pared celular de plantas o la mucosa de mamíferos (Higgins, y col., 2011). Por otro lado, las regiones inter-dominio que presentan una estructura definida indican una relación co-dependiente entre el CBM y el DC, indicando un alineamiento entre el sitio de unión de los CBM y el DC y sugiriendo que esto estaría involucrado en su mecanismo molecular (Lammerts van Bueren, y col., 2011).

Los diferentes determinantes estructurales descriptos en este trabajo sugieren que el arreglo en tándem de ATXYN1 puede representar una estrategia sofisticada de cooperación en la cual XYL2 estaría involucrada en el reconocimiento del sustrato, XYL1 en la disrupción del mismo, mientras que XYL3 estaría actuando a un nivel estructural. En efecto, trabajo adicional es necesario para confirmar estas hipótesis y para aclarar el mecanismo propuesto y utilizado por la naturaleza para adaptar la especificidad de sustrato a la compleja red de polisacáridos que



constituye la pared celular. Este conocimiento es crucial para entender todo el potencial de estos posibles biocatalizadores, necesarios para mejorar la eficiencia de industrias de bioprocesamiento.

El uso de enzimas nativas o modificadas tiene el potencial de reducir el costo de producción de los biocombustibles. Actualmente cócteles fúngicos son utilizados para la hidrólisis de biomasa, los cuales pueden consistir en más de 50 polipéptidos. Estos cócteles pueden mejorarse eliminando proteínas no funcionales o redundantes, estabilizando enzimas claves frente a diversos tipos de inactivación o sustituyendo enzimas con distinta afinidad por los sustratos (Walker, y col., 2015).

Evidencias crecientes demuestran que los CBM presentan un rol disruptivo (Din, y col., 1991; Gao, y col., 2000; Xiao, y col., 2001; Pinto, y col., 2004; Wang, y col., 2008; Hall, y col., 2011), y pueden accionar frente la actividad de ciertas enzimas como celulasas (Gao, y col., 2000; Lemos, y col., 2003; Moser, y col., 2008; Hall, y col., 2011; Mello y Polikarpov, 2014).

De esta manera, la alteración de los sustratos por la acción de alguna de las proteínas de estos cócteles, puede ser crítica, debido a la posibilidad de accionar sobre los parámetros cinéticos del conjunto de las enzimas. Nosotros determinamos que no todos los CBM, por más que estén estrechamente relacionados, pueden modificar de la misma manera la actividad de una enzima. Normalmente se cree que la estructura modular de las “CAZymes” se basa en un efecto de avidéz y, en este trabajo observamos que la presencia de tres CBM en tándem en ATXYN1 de *A. thaliana* tienen posiblemente roles complementarios.

# CONCLUSIONES

---

El objetivo de esta tesis fue encontrar posibles aplicaciones biotecnológicas de los módulos de unión a carbohidratos de *Arabidopsis thaliana*. De esta manera, se encontraron dos grandes utilidades para estos dominios y la información obtenida podría ser utilizada para desarrollar nuevos enfoques, tanto con estos módulos como con otros CBM pertenecientes a otras proteínas.

En primer lugar, se observó que la expresión de los dominios SBD en la pared celular de *A. thaliana* fue capaz de generar el mejoramiento vegetal requerido por diversas industrias, como la del biocombustible o la ganadera. El incremento en la biomasa y en la digestibilidad de las plantas transgénicas, colocan a esta tecnología en el foco del actual paradigma en la sacarificación de biomasa: “modificación de los sustratos en lugar de la ingeniería de enzimas”. Además, se utilizaron estas plantas como modelo para el estudio de la partición del carbono entre los polisacáridos estructurales y de reserva. La información obtenida permite explicar la ausencia de penalidades evidentes en las líneas E8-SBD123. A partir de estos estudios, hemos planteado colaboraciones con INTA para la transformación de alfalfa con construcciones más pequeñas, derivadas de las estudiadas en este trabajo.

En segundo lugar, hemos encontrado que el dominio XYL1 de la xilanasa ATXYN1 de *A. thaliana* es capaz de afectar la actividad catalítica de proteínas comerciales *in trans*. Son necesarios continuar y profundizar estos estudios para probar el efecto de este dominio dentro de cócteles comerciales utilizados para la sacarificación de sustratos poliméricos. El desarrollo de esta tecnología, podría ser una gran contribución a las industrias orientadas hacia la degradación de biomasa. Además, se encontraron posibles justificaciones al comportamiento diferencial de los tres CBM de ATXYN1. El estudio de quimeras será necesario para corroborar estas especulaciones. También estos estudios permitieron ampliar el conocimiento bioquímico y estructural de estos dominios y suministraron la información necesaria para confirmar la clasificación de los mismos como miembros de la familia de CBM 22. Finalmente, podemos afirmar que la información obtenida en esta tesis, constituye un eslabón crítico en la utilización de los módulos de unión a carbohidratos como herramientas biotecnológicas.

# BIBLIOGRAFÍA

---

- Abbott, D.W., y Boraston, A.B. (2012). Quantitative approaches to the analysis of carbohydrate-binding module function. *Methods in enzymology* 510, 211-231.
- Abbott, D.W., y Van Bueren, A.L. (2014). Using structure to inform carbohydrate binding module function. *Curr Opin Struct Biol* 28, 32-40.
- Abbott, W.D., Eirín-López, J., y Boraston, A.B. (2008). Insight into ligand diversity and novel biological roles for family 32 carbohydrate-binding modules. *Molecular biology and evolution* 25, 155-167.
- Abramoff, M.D., Magelhaes, P.J., y Ram, S.J. (2004). Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11, 36-42.
- Aguayo, M.F., Ampuero, D., Mandujano, P., Parada, R., Munoz, R., Gallart, M., Altabella, T., Cabrera, R., Stange, C., y Handford, M. (2013). Sorbitol dehydrogenase is a cytosolic protein required for sorbitol metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 205-206, 63-75.
- Alahuhta, M., Luo, Y., Ding, S.Y., Himmel, M.E., y Lunin, V.V. (2011). Structure of CBM4 from *Clostridium thermocellum* cellulase K. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications* 67, 527-530.
- Albrecht, G., y Mustroph, A. (2003). Localization of sucrose synthase in wheat roots: increased in situ activity of sucrose synthase correlates with cell wall thickening by cellulose deposition under hypoxia. *Planta* 217, 252-260.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., y Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403-410.
- Amatsu, S., Sugawara, Y., Matsumura, T., Kitadokoro, K., y Fujinaga, Y. (2013). Crystal structure of *Clostridium botulinum* whole hemagglutinin reveals a huge triskelion-shaped molecular complex. *J Biol Chem* 288, 35617-35625.
- Amor, Y., Haigler, C.H., Johnson, S., Wainscott, M., y Delmer, D.P. (1995). A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9353-9357.

- Andrade, M.A., Chacon, P., Merelo, J.J., y Moran, F. (1993). Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Eng* 6, 383-390.
- Araki, R., Karita, S., Tanaka, A., Kimura, T., y Sakka, K. (2006). Effect of family 22 carbohydrate-binding module on the thermostability of Xyn10B catalytic module from *Clostridium stercorarium*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 70, 3039-3041.
- Arantes, V., y Saddler, J.N. (2010). Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnol Biofuels* 3, 4.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., y Schwede, T. (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*. 22, 195-201.
- Babb, V.M., y Haigler, C.H. (2001). Sucrose phosphate synthase activity rises in correlation with high-rate cellulose synthesis in three heterotrophic systems. *Plant Physiol* 127, 1234-1242.
- Bai, L., Zhang, G., Zhou, Y., Zhang, Z., Wang, W., Du, Y., Wu, Z., y Song, C.P. (2009). Plasma membrane-associated proline-rich extensin-like receptor kinase 4, a novel regulator of Ca signalling, is required for abscisic acid responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 60, 314-327.
- Ball, S.G., y Morell, M.K. (2003). From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Annu Rev Plant Biol* 54, 207-233.
- Bancos, S., Szatmari, A.M., Castle, J., Kozma-Bognar, L., Shibata, K., Yokota, T., Bishop, G.J., Nagy, F., y Szekeres, M. (2006). Diurnal regulation of the brassinosteroid-biosynthetic CPD gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 141, 299-309.
- Banerji, A., Balakrishnan, M., y Kishore, V.V.N. (2013). Low severity dilute-acid hydrolysis of sweet sorghum bagasse. *Applied Energy* 104, 197-206.
- Beemster, G.T., y Baskin, T.I. (1998). Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 116, 1515-1526.

- Behera, P.K., Mukherjee, T., y Mishra, A.K. (1995). Simultaneous presence of static and dynamic component in the fluorescence quenching for substituted naphthalene—CCl<sub>4</sub> system. *Journal of Luminescence* 65, 131-136.
- Benkert, P., Schwede, T., y Tosatto, S.C. (2009). QMEANclust: estimation of protein model quality by combining a composite scoring function with structural density information. *BMC Struct Biol* 9, 35.
- Bergmeyer, H.-U. (2012). *Methods of enzymatic analysis*. Elsevier.
- Berrin, J.G., y Juge, N. (2008). Factors affecting xylanase functionality in the degradation of arabinoxylans. *Biotechnol.Lett.* 30, 1139-1150.
- Bhat, M.K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol Adv* 18, 355-383.
- Biswal, A.K., Hao, Z., Pattathil, S., Yang, X., Winkeler, K., Collins, C., Mohanty, S.S., Richardson, E.A., Gelineo-Albersheim, I., Hunt, K., Ryno, D., Sykes, R.W., Turner, G.B., Ziebell, A., Gjersing, E., Lukowitz, W., Davis, M.F., Decker, S.R., Hahn, M.G., y Mohnen, D. (2015). Downregulation of GAUT12 in *Populus deltoides* by RNA silencing results in reduced recalcitrance, increased growth and reduced xylan and pectin in a woody biofuel feedstock. *Biotechnol Biofuels* 8, 41.
- Blumenkrantz, N., y Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal.Biochem.* 54, 484-489.
- Bolam, D.N., Ciruela, A., Mcqueen-Mason, S., Simpson, P., Williamson, M.P., Rixon, J.E., Boraston, A., Hazlewood, G.P., y Gilbert, H.J. (1998). Pseudomonas cellulose-binding domains mediate their effects by increasing enzyme substrate proximity. *Biochemical Journal* 331, 775-781.
- Boraston, A.B. (2004). Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem J* 382.
- Boraston, A.B., Bolam, D.N., Gilbert, H.J., y Davies, G.J. (2004). Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem J* 382, 769-781.

- Boraston, A.B., Notenboom, V., Warren, R.A., Kilburn, D.G., Rose, D.R., y Davies, G. (2003). Structure and ligand binding of carbohydrate-binding module CsCBM6-3 reveals similarities with fucose-specific lectins and "galactose-binding" domains. *J Mol Biol* 327, 659-669.
- Boraston, A.B., Tomme, P., Amandoron, E.A., y Kilburn, D.G. (2000). A novel mechanism of xylan binding by a lectin-like module from *Streptomyces lividans* xylanase 10A. *Biochem J* 350 Pt 3, 933-941.
- Boratyn, G.M., Schaffer, A.A., Agarwala, R., Altschul, S.F., Lipman, D.J., y Madden, T.L. (2012). Domain enhanced lookup time accelerated BLAST. *Biol Direct* 7, 12.
- Botticella, E., Sestili, F., Hernandez-Lopez, A., Phillips, A., y Lafandra, D. (2011). High resolution melting analysis for the detection of EMS induced mutations in wheat SBEIIa genes. *BMC Plant Biol* 11, 156.
- Boyes, D.C., Zayed, A.M., Ascenzi, R., Mccaskill, A.J., Hoffman, N.E., Davis, K.R., y Gorlach, J. (2001). Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* 13, 1499-1510.
- Braccini, I., y Pérez, S. (2001). Molecular Basis of Ca<sup>2+</sup>-Induced Gelation in Alginates and Pectins: The Egg-Box Model Revisited. *Biomacromolecules* 2, 1089-1096.
- Buleon, A., Colonna, P., Planchot, V., y Ball, S. (1998). Starch granules: structure and biosynthesis. *International journal of biological macromolecules* 23, 85-112.
- Busi, M., Gomez-Casati, D., Martín, M., Barchiesi, J., Grisolia, M., Hedín, N., y Carrillo, J. (2014). "Starch Metabolism in Green Plants," in *Polysaccharides*, eds. K.G. Ramawat & J.-M. Mérillon. Springer International Publishing), 1-42.
- Busi, M.V., Palopoli, N., Valdez, H.A., Fornasari, M.S., Wayllace, N.Z., Gomez-Casati, D.F., Parisi, G., y Ugalde, R.A. (2008). Functional and structural characterization of the catalytic domain of the starch synthase III from *Arabidopsis thaliana*. *Proteins* 70, 31-40.



- Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., y Henrissat, B. (2009a). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res* 37, D233-238.
- Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., y Henrissat, B. (2009b). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res* 37.
- Carpita, N.C. (1996). Structure and Biogenesis of the Cell Walls of Grasses. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47, 445-476.
- Carrard, G., Koivula, A., Soderlund, H., y Beguin, P. (2000). Cellulose-binding domains promote hydrolysis of different sites on crystalline cellulose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97.
- Cassab, G.I. (1998). Plant Cell Wall Proteins. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49, 281-309.
- Cleland, R. (1971). Cell Wall Extension. *Annual Review of Plant Physiology* 22, 197-222.
- Clough, S.J., y Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735-743.
- Cordoba, F., y Gonzalez-Reyes, J.A. (1994). Ascorbate and plant cell growth. *J Bioenerg Biomembr* 26, 399-405.
- Cosgrove, D.J. (1993). How do plant cell walls extend? *Plant Physiol* 102, 1-6.
- Coutinho, J.B., Gilkes, N.R., Kilburn, D.G., Warren, R.a.J., y Miller, R.C. (1993). The nature of the cellulose-binding domain effects the activities of a bacterial endoglucanase on different forms of cellulose. *FEMS Microbiology Letters* 113, 211-217.
- Creagh, A.L., Ong, E., Jervis, E., Kilburn, D.G., y Haynes, C.A. (1996). Binding of the cellulose-binding domain of exoglucanase Cex from *Cellulomonas fimi* to insoluble microcrystalline cellulose is entropically driven. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 12229-12234.

- Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.M., y Brenner, S.E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* 14, 1188-1190.
- Culbertson, A.T., Chou, Y.H., Smith, A.L., Young, Z.T., Tietze, A.A., Cottaz, S., Faure, R., y Zabolina, O.A. (2016). Enzymatic Activity of Xyloglucan Xylosyltransferase 5. *Plant Physiol* 171, 1893-1904.
- Cuskin, F., Flint, J.E., Gloster, T.M., Morland, C., Basle, A., Henrissat, B., Coutinho, P.M., Strazzulli, A., Solovyova, A.S., Davies, G.J., y Gilbert, H.J. (2012). How nature can exploit nonspecific catalytic and carbohydrate binding modules to create enzymatic specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 20889-20894.
- Charnock, S.J., Bolam, D.N., Turkenburg, J.P., Gilbert, H.J., Ferreira, L.M., Davies, G.J., y Fontes, C.M. (2000). The X6 "thermostabilizing" domains of xylanases are carbohydrate-binding modules: structure and biochemistry of the *Clostridium thermocellum* X6b domain. *Biochemistry* 39, 5013-5021.
- Chen, H., Kim, H.U., Weng, H., y Browse, J. (2011). Malonyl-CoA synthetase, encoded by ACYL ACTIVATING ENZYME13, is essential for growth and development of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23, 2247-2262.
- Chiang, H.H., y Dandekar, A.M. (1995). Regulation of proline accumulation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh during development and in response to desiccation. *Plant, Cell and Environment* 18, 1280-1290.
- Cho, J.I., Ryoo, N., Eom, J.S., Lee, D.W., Kim, H.B., Jeong, S.W., Lee, Y.H., Kwon, Y.K., Cho, M.H., Bhoo, S.H., Hahn, T.R., Park, Y.I., Hwang, I., Sheen, J., y Jeon, J.S. (2009). Role of the rice hexokinases OsHXX5 and OsHXX6 as glucose sensors. *Plant Physiol* 149, 745-759.
- D'amour, J., Gosselin, C., Arul, J., Castaigne, F., y Willemot, C. (1993). Gamma-Radiation Affects Cell Wall Composition of Strawberries. *Journal of Food Science* 58, 182-185.
- De Beer, T.A., Berka, K., Thornton, J.M., y Laskowski, R.A. (2014). PDBsum additions. *Nucleic Acids Res* 42, D292-296.

- Delvalle, D., Dumez, S., Wattebled, F., Roldan, I., Planchot, V., Berbezy, P., Colonna, P., Vyas, D., Chatterjee, M., Ball, S., Merida, A., y D'hulst, C. (2005). Soluble starch synthase I: a major determinant for the synthesis of amylopectin in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant J* 43, 398-412.
- Denyer, K., Sidebottom, C., Hylton, C.M., y Smith, A.M. (1993). Soluble isoforms of starch synthase and starch-branching enzyme also occur within starch granules in developing pea embryos. *Plant J* 4, 191-198.
- Deprost, D., Yao, L., Sormani, R., Moreau, M., Leterreux, G., Nicolai, M., Bedu, M., Robaglia, C., y Meyer, C. (2007). The *Arabidopsis* TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Rep* 8, 864-870.
- Desprez, T., Juraniec, M., Crowell, E.F., Jouy, H., Pochylova, Z., Parcy, F., Hofte, H., Gonneau, M., y Vernhettes, S. (2007). Organization of cellulose synthase complexes involved in primary cell wall synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15572-15577.
- Din, N., Damude, H.G., Gilkes, N.R., Miller, R.C., Jr., Warren, R.A., y Kilburn, D.G. (1994). C1-Cx revisited: intramolecular synergism in a cellulase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11383-11387.
- Din, N., Gilkes, N.R., Tekant, B., Miller, R.C., Warren, R.a.J., y Kilburn, D.G. (1991). Non-Hydrolytic Disruption of Cellulose Fibres by the Binding Domain of a Bacterial Cellulase. *Nat Biotech* 9, 1096-1099.
- Doblin, M.S., Johnson, K.L., Humphries, J., Newbigin, E.J., y Bacic, A. (2014). Are designer plant cell walls a realistic aspiration or will the plasticity of the plant's metabolism win out? *Curr Opin Biotechnol* 26, 108-114.
- Donnelly, P.M., Bonetta, D., Tsukaya, H., Dengler, R.E., y Dengler, N.G. (1999). Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of *Arabidopsis*. *Dev Biol* 215, 407-419.
- Dubovskii, P.V., Vassilevski, A.A., Slavokhotova, A.A., Odintsova, T.I., Grishin, E.V., Egorov, T.A., y Arseniev, A.S. (2011). Solution structure of a defense peptide from wheat with a 10-cysteine motif. *Biochem Biophys Res Commun* 411, 14-18.

- Duryea, M.L. (1985). Evaluating seedling quality: principles, procedures, and predictive abilities of major tests: proceedings of the workshop held October 16-18, 1984.
- Eddy, S.R. (Year). "Multiple alignment using hidden Markov models", in: *Ismb*), 114-120.
- Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32, 1792-1797.
- Eftink, M.R., y Ghiron, C.A. (1981). Fluorescence quenching studies with proteins. *Anal Biochem* 114, 199-227.
- Endler, A., y Persson, S. (2011). Cellulose synthases and synthesis in Arabidopsis. *Mol Plant* 4, 199-211.
- Englyst, K.N., y Englyst, H.N. (2005). Carbohydrate bioavailability. *The British journal of nutrition* 94, 1-11.
- Eudes, A., George, A., Mukerjee, P., Kim, J.S., Pollet, B., Benke, P.I., Yang, F., Mitra, P., Sun, L., Cetinkol, O.P., Chabout, S., Mouille, G., Soubigou-Taconnat, L., Balzergue, S., Singh, S., Holmes, B.M., Mukhopadhyay, A., Keasling, J.D., Simmons, B.A., Lapierre, C., Ralph, J., y Loque, D. (2012). Biosynthesis and incorporation of side-chain-truncated lignin monomers to reduce lignin polymerization and enhance saccharification. *Plant Biotechnol J* 10, 609-620.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* 39, 783.
- Ficko-Blean, E., y Boraston, A.B. (2009). N-acetylglucosamine recognition by a family 32 carbohydrate-binding module from *Clostridium perfringens* NagH. *J Mol Biol* 390, 208-220.
- Flynn, R.L., y Zou, L. (2010). Oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold proteins: a growing family of genome guardians. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 45, 266-275.
- Fontes, C.M., Hazlewood, G.P., Morag, E., Hall, J., Hirst, B.H., y Gilbert, H.J. (1995). Evidence for a general role for non-catalytic thermostabilizing domains in xylanases from thermophilic bacteria. *Biochem J* 307 ( Pt 1), 151-158.

- Gao, P., Chen, G., Wang, T., Zhang, Y., y Liu, J. (2000). Non-hydrolytic Disruption of Crystalline Structure of Cellulose by Cellulose Binding Domain and Linker Sequence of Cellobiohydrolase I from *Penicillium janthinellum*. *Sheng wu hua xue yu sheng wu wu li xue bao Acta biochimica et biophysica Sinica* 33, 13-18.
- Gaskell, A., Crennell, S., y Taylor, G. (1995). The three domains of a bacterial sialidase: a beta-propeller, an immunoglobulin module and a galactose-binding jelly-roll. *Structure* 3, 1197-1205.
- Ge, Y., Antoulinakis, E.G., Gee, K.R., y Johnson, I. (2007). An ultrasensitive, continuous assay for xylanase using the fluorogenic substrate 6,8-difluoro-4-methylumbelliferyl beta-D-xylobioside. *Anal Biochem* 362, 63-68.
- Gibson, K., Park, J.S., Nagai, Y., Hwang, S.K., Cho, Y.C., Roh, K.H., Lee, S.M., Kim, D.H., Choi, S.B., Ito, H., Edwards, G.E., y Okita, T.W. (2011). Exploiting leaf starch synthesis as a transient sink to elevate photosynthesis, plant productivity and yields. *Plant Sci* 181, 275-281.
- Gibson, T.S., Solah, V.A., y McCleary, B.V. (1997). A Procedure to Measure Amylose in Cereal Starches and Flours with Concanavalin A. *Journal of Cereal Science* 25, 111-119.
- Gilbert, H.J. (2010). The biochemistry and structural biology of plant cell wall deconstruction. *Plant Physiol* 153, 444-455.
- Gilbert, H.J., Knox, J.P., y Boraston, A.B. (2013). Advances in understanding the molecular basis of plant cell wall polysaccharide recognition by carbohydrate-binding modules. *Curr Opin Struct Biol* 23, 669-677.
- Gilbert, H.J., Stalbrand, H., y Brumer, H. (2008). How the walls come crumbling down: recent structural biochemistry of plant polysaccharide degradation. *Curr Opin Plant Biol* 11.
- Gilkes, N.R., Warren, R.A., Miller, R.C., Jr., y Kilburn, D.G. (1988). Precise excision of the cellulose binding domains from two *Cellulomonas fimi* cellulases by a homologous protease and the effect on catalysis. *J.Biol.Chem.* 263, 10401-10407.
- Gomes, J., Purkharthofer, H., Hayn, M., Kapplmüller, J., Sinner, M., y Steiner, W. (1993). Production of a high level of cellulase-free xylanase by the thermophilic fungus

- Thermomyces lanuginosus in laboratory and pilot scales using lignocellulosic materials. *Applied Microbiology and Biotechnology* 39, 700-707.
- Gomez-Casati, D.F., Martin, M., y Busi, M.V. (2013). Polysaccharide-synthesizing glycosyltransferases and carbohydrate binding modules: the case of starch synthase III. *Protein Pept Lett* 20, 856-863.
- Gourlay, K., Arantes, V., y Saddler, J.N. (2012). Use of substructure-specific carbohydrate binding modules to track changes in cellulose accessibility and surface morphology during the amorphogenesis step of enzymatic hydrolysis. *Biotechnol Biofuels* 5, 51.
- Guillen, D., Santiago, M., Linares, L., Perez, R., Morlon, J., Ruiz, B., Sanchez, S., y Rodriguez-Sanoja, R. (2007). Alpha-amylase starch binding domains: cooperative effects of binding to starch granules of multiple tandemly arranged domains. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3833-3837.
- Guo, H., Li, L., Ye, H., Yu, X., Algreen, A., y Yin, Y. (2009a). Three related receptor-like kinases are required for optimal cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 7648-7653.
- Guo, H., Ye, H., Li, L., y Yin, Y. (2009b). A family of receptor-like kinases are regulated by BES1 and involved in plant growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal. Behav.* 4, 784-786.
- Haigler, C.H., Ivanova-Datcheva, M., Hogan, P.S., Salnikov, V.V., Hwang, S., Martin, K., y Delmer, D.P. (2001). Carbon partitioning to cellulose synthesis. *Plant Mol Biol* 47, 29-51.
- Hall, J. (1995). The non-catalytic cellulose-binding domain of a novel cellulase from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* is important for the efficient hydrolysis of Avicel. *Biochem J* 309.
- Hall, M., Bansal, P., Lee, J.H., Realff, M.J., y Bommarius, A.S. (2011). Biological pretreatment of cellulose: enhancing enzymatic hydrolysis rate using cellulose-binding domains from cellulases. *Bioresour Technol* 102, 2910-2915.

- Han, R., Li, J., Shin, H.D., Chen, R.R., Du, G., Liu, L., y Chen, J. (2013). Carbohydrate-binding module-cyclodextrin glycosyltransferase fusion enables efficient synthesis of 2-O-d-glucopyranosyl-l-ascorbic acid with soluble starch as the glycosyl donor. *Appl Environ Microbiol* 79, 3234-3240.
- Hashimoto, H. (2006). Recent structural studies of carbohydrate-binding modules. *Cell Mol Life Sci* 63, 2954-2967.
- Hatfield, R.D., Grabber, J., Ralph, J., y Brei, K. (1999). Using the Acetyl Bromide Assay To Determine Lignin Concentrations in Herbaceous Plants: Some Cautionary Notes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 628-632.
- Hematy, K., Sado, P.E., Van, T.A., Rochange, S., Desnos, T., Balzergue, S., Pelletier, S., Renou, J.P., y Hofte, H. (2007a). A receptor-like kinase mediates the response of Arabidopsis cells to the inhibition of cellulose synthesis. *Curr.Biol.* 17, 922-931.
- Hematy, K., Sado, P.E., Van Tuinen, A., Rochange, S., Desnos, T., Balzergue, S., Pelletier, S., Renou, J.P., y Hofte, H. (2007b). A receptor-like kinase mediates the response of Arabidopsis cells to the inhibition of cellulose synthesis. *Curr Biol* 17, 922-931.
- Hennen-Bierwagen, T.A., Lin, Q., Grimaud, F., Planchot, V., Keeling, P.L., James, M.G., y Myers, A.M. (2009). Proteins from multiple metabolic pathways associate with starch biosynthetic enzymes in high molecular weight complexes: a model for regulation of carbon allocation in maize amyloplasts. *Plant Physiol* 149, 1541-1559.
- Hennen-Bierwagen, T.A., Liu, F., Marsh, R.S., Kim, S., Gan, Q., Tetlow, I.J., Emes, M.J., James, M.G., y Myers, A.M. (2008). Starch biosynthetic enzymes from developing maize endosperm associate in multisubunit complexes. *Plant Physiol* 146, 1892-1908.
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 280.
- Henshaw, J.L., Bolam, D.N., Pires, V.M., Czjzek, M., Henrissat, B., Ferreira, L.M., Fontes, C.M., y Gilbert, H.J. (2004). The family 6 carbohydrate binding module CmCBM6-2 contains two ligand-binding sites with distinct specificities. *J Biol Chem* 279, 21552-21559.

- Hervé, C., Rogowski, A., Blake, A.W., Marcus, S.E., Gilbert, H.J., y Knox, J.P. (2010). Carbohydrate-binding modules promote the enzymatic deconstruction of intact plant cell walls by targeting and proximity effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107.
- Higgins, M.A., Ficko-Blean, E., Meloncelli, P.J., Lowary, T.L., y Boraston, A.B. (2011). The overall architecture and receptor binding of pneumococcal carbohydrate-antigen-hydrolyzing enzymes. *J Mol Biol* 411, 1017-1036.
- Hoebler, C., Barry, J.L., David, A., y Delort-Laval, J. (1989). Rapid acid hydrolysis of plant cell wall polysaccharides and simplified quantitative determination of their neutral monosaccharides by gas-liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37, 360-367.
- Hoffmam, Z.B., Zanthorlin, L.M., Cota, J., Diogo, J.A., Almeida, G.B., Damasio, A.R., Squina, F., Murakami, M.T., y Ruller, R. (2016). Xylan-specific carbohydrate-binding module belonging to family 6 enhances the catalytic performance of a GH11 endo-xylanase. *N Biotechnol* 33, 467-472.
- Horiguchi, G., Kim, G.T., y Tsukaya, H. (2005). The transcription factor AtGRF5 and the transcription coactivator AN3 regulate cell proliferation in leaf primordia of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 43, 68-78.
- Horn, S.J., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., y Eijsink, V.G. (2012). Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnol Biofuels* 5, 45.
- Hunt, R., Causton, D.R., Shipley, B., y Askew, A.P. (2002). A modern tool for classical plant growth analysis. *Ann Bot* 90, 485-488.
- Hutchinson, E.G., y Thornton, J.M. (1996). PROMOTIF—a program to identify and analyze structural motifs in proteins. *Protein Science* 5, 212-220.
- Iiyama, K., y Wallis, A.F.A. (1988). An improved acetyl bromide procedure for determining lignin in woods and wood pulps. *Wood Science and Technology* 22, 271-280.
- Ingkasuwan, P., Netrphan, S., Prasitwattanaseree, S., Tanticharoen, M., Bhumiratana, S., Meechai, A., Chaijaruwanich, J., Takahashi, H., y Cheevadhanarak, S. (2012). Inferring



- transcriptional gene regulation network of starch metabolism in *Arabidopsis thaliana* leaves using graphical Gaussian model. *BMC Syst Biol* 6, 100.
- Irwin, D., Shin, D.H., Zhang, S., Barr, B.K., Sakon, J., Karplus, P.A., y Wilson, D.B. (1998). Roles of the catalytic domain and two cellulose binding domains of *Thermomonospora fusca* E4 in cellulose hydrolysis. *J Bacteriol* 180, 1709-1714.
- Jamal, S., Nurizzo, D., Boraston, A.B., y Davies, G.J. (2004). X-ray crystal structure of a non-crystalline cellulose-specific carbohydrate-binding module: CBM28. *J Mol Biol* 339, 253-258.
- James, M.G., Denyer, K., y Myers, A.M. (2003). Starch synthesis in the cereal endosperm. *Curr Opin Plant Biol* 6, 215-222.
- Jenkins, P.J., y Donald, A.M. (1995). The influence of amylose on starch granule structure. *Int J Biol Macromol* 17, 315-321.
- Jervis, E.J., Haynes, C.A., y Kilburn, D.G. (1997). Surface Diffusion of Cellulases and Their Isolated Binding Domains on Cellulose. *Journal of Biological Chemistry* 272, 24016-24023.
- Jiang, T.Y., Ci, Y.P., Chou, W.L., Lee, Y.C., Sun, Y.J., Chou, W.Y., Li, K.M., y Chang, M.D. (2012). Two unique ligand-binding clamps of *Rhizopus oryzae* starch binding domain for helical structure disruption of amylose. *PLoS One* 7, e41131.
- Kalluri, U.C., Yin, H., Yang, X., y Davison, B.H. (2014). Systems and synthetic biology approaches to alter plant cell walls and reduce biomass recalcitrance. *Plant Biotechnol J* 12, 1207-1216.
- Karve, A., y Moore, B.D. (2009). Function of *Arabidopsis* hexokinase-like1 as a negative regulator of plant growth. *J Exp Bot* 60, 4137-4149.
- Karve, A., Rauh, B.L., Xia, X., Kandasamy, M., Meagher, R.B., Sheen, J., y Moore, B.D. (2008). Expression and evolutionary features of the hexokinase gene family in *Arabidopsis*. *Planta* 228, 411-425.
- Kavoosi, M., Meijer, J., Kwan, E., Creagh, A.L., Kilburn, D.G., y Haynes, C.A. (2004). Inexpensive one-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as

- fusions with the family 9 carbohydrate-binding module of xylanase 10A from *T. maritima*. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 807, 87-94.
- Keizer, J. (1983). Nonlinear fluorescence quenching and the origin of positive curvature in Stern-Volmer plots. *Journal of the American Chemical Society* 105, 1494-1498.
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., y Sternberg, M.J. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* 10, 845-858.
- Kerk, D., Conley, T.R., Rodriguez, F.A., Tran, H.T., Nimick, M., Muench, D.G., y Moorhead, G.B. (2006). A chloroplast-localized dual-specificity protein phosphatase in *Arabidopsis* contains a phylogenetically dispersed and ancient carbohydrate-binding domain, which binds the polysaccharide starch. *Plant J* 46, 400-413.
- Koch, K. (2004). Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr Opin Plant Biol* 7, 235-246.
- Kolling, K., Thalmann, M., Muller, A., Jenny, C., y Zeeman, S.C. (2015). Carbon partitioning in *Arabidopsis thaliana* is a dynamic process controlled by the plants metabolic status and its circadian clock. *Plant Cell Environ.*
- Koornneef, M., Hanhart, C.J., y Van Der Veen, J.H. (1991). A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular & general genetics : MGG* 229, 57-66.
- Kopka, J., Schauer, N., Krueger, S., Birkemeyer, C., Usadel, B., Bergmuller, E., Dormann, P., Weckwerth, W., Gibon, Y., Stitt, M., Willmitzer, L., Fernie, A.R., y Steinhauser, D. (2005). GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database. *Bioinformatics* 21, 1635-1638.
- Kumar, S., Stecher, G., y Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.*
- Lairson, L.L., Henrissat, B., Davies, G.J., y Withers, S.G. (2008). Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annu Rev Biochem* 77, 521-555.

- Lammerts Van Bueren, A., Ficko-Blean, E., Pluvinae, B., Hehemann, J.H., Higgins, M.A., Deng, L., Ogunniyi, A.D., Stroehner, U.H., El Warry, N., Burke, R.D., Czjzek, M., Paton, J.C., Vocadlo, D.J., y Boraston, A.B. (2011). The conformation and function of a multimodular glycogen-degrading pneumococcal virulence factor. *Structure* 19, 640-651.
- Larran, A., Jozami, E., Vicario, L., Feldman, S.R., Podesta, F.E., y Permingeat, H.R. (2015). Evaluation of biological pretreatments to increase the efficiency of the saccharification process using *Spartina argentinensis* as a biomass resource. *Bioresour Technol* 194, 320-325.
- Laskowski, R.A., Hutchinson, E.G., Michie, A.D., Wallace, A.C., Jones, M.L., y Thornton, J.M. (1997). PDBsum: a web-based database of summaries and analyses of all PDB structures. *Trends in Biochemical Sciences* 22, 488-490.
- Lavarack, B.P., Griffin, G.J., y Rodman, D. (2002). The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. *Biomass and Bioenergy* 23, 367-380.
- Lee, J., y Blaber, M. (2011). Experimental support for the evolution of symmetric protein architecture from a simple peptide motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 126-130.
- Lee, Y., Choi, D., y Kende, H. (2001). Expansins: ever-expanding numbers and functions. *Curr Opin Plant Biol* 4, 527-532.
- Legrand, P., Collins, B., Blangy, S., Murphy, J., Spinelli, S., Gutierrez, C., Richet, N., Kellenberger, C., Desmyter, A., Mahony, J., Van Sinderen, D., y Cambillau, C. (2016). The Atomic Structure of the Phage Tuc2009 Baseplate Tripod Suggests that Host Recognition Involves Two Different Carbohydrate Binding Modules. *MBio* 7, e01781-01715.
- Lehtio, J., Sugiyama, J., Gustavsson, M., Fransson, L., Linder, M., y Teeri, T.T. (2003). The binding specificity and affinity determinants of family 1 and family 3 cellulose binding modules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100.
- Lemos, M.A., Teixeira, J.A., Domingues, M.R.M., Mota, M., y Gama, F.M. (2003). The enhancement of the cellulolytic activity of cellobiohydrolase I and endoglucanase by

- the addition of cellulose binding domains derived from *Trichoderma reesei*. *Enzyme and Microbial Technology* 32, 35-40.
- Levy, I., Shani, Z., y Shoseyov, O. (2002). Modification of polysaccharides and plant cell wall by endo-1, 4- $\beta$ -glucanase and cellulose-binding domains. *Biomolecular engineering* 19, 14.
- Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., y Fernie, A.R. (2006). Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nat Protoc* 1, 387-396.
- Loque, D., Scheller, H.V., y Pauly, M. (2015). Engineering of plant cell walls for enhanced biofuel production. *Curr Opin Plant Biol* 25, 151-161.
- Louis-Jeune, C., Andrade-Navarro, M.A., y Perez-Iratxeta, C. (2012). Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 80, 374-381.
- Madsen, E. (1968). Effect of CO<sub>2</sub>-Concentration on the Accumulation of Starch and Sugar in Tomato Leaves. *Physiologia Plantarum* 21, 168-175.
- Malecki, P.H., Raczynska, J.E., Vorgias, C.E., y Rypniewski, W. (2013). Structure of a complete four-domain chitinase from *Moritella marina*, a marine psychrophilic bacterium. *Acta Crystallographica Section D* 69, 821-829.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J.B., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., Deweese-Scott, C., Fong, J.H., Geer, L.Y., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., He, S., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Ke, Z., Lanczycki, C.J., Liebert, C.A., Liu, C., Lu, F., Lu, S., Marchler, G.H., Mullokandov, M., Song, J.S., Tasneem, A., Thanki, N., Yamashita, R.A., Zhang, D., Zhang, N., y Bryant, S.H. (2009). CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res* 37, D205-210.
- Marchler-Bauer, A., y Bryant, S.H. (2004). CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res* 32, W327-331.
- Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J.B., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., Deweese-Scott, C., Fong, J.H., Geer, L.Y., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Ke, Z., Lanczycki, C.J., Lu, F., Marchler, G.H., Mullokandov, M., Omelchenko,

- M.V., Robertson, C.L., Song, J.S., Thanki, N., Yamashita, R.A., Zhang, D., Zhang, N., Zheng, C., y Bryant, S.H. (2011). CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res* 39, D225-229.
- Marchler-Bauer, A., Zheng, C., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., Geer, L.Y., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Lanczycki, C.J., Lu, F., Lu, S., Marchler, G.H., Song, J.S., Thanki, N., Yamashita, R.A., Zhang, D., y Bryant, S.H. (2012). CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure. *Nucleic Acids Res*.
- Marga, F., Grandbois, M., Cosgrove, D.J., y Baskin, T.I. (2005). Cell wall extension results in the coordinate separation of parallel microfibrils: evidence from scanning electron microscopy and atomic force microscopy. *Plant J* 43, 181-190.
- Mattinen, M.L., Linder, M., Drakenberg, T., y Annala, A. (1998). Solution structure of the cellulose-binding domain of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* and its interaction with cello-oligosaccharides. *Eur J Biochem* 256, 279-286.
- Mcintosh, L.P., Hand, G., Johnson, P.E., Joshi, M.D., Körner, M., Plesniak, L.A., Ziser, L., Wakarchuk, W.W., y Withers, S.G. (1996). The pKa of the General Acid/Base Carboxyl Group of a Glycosidase Cycles during Catalysis: A <sup>13</sup>C-NMR Study of *Bacillus circulans* Xylanase. *Biochemistry* 35, 9958-9966.
- Mckinley, B., Rooney, W., Wilkerson, C., y Mullet, J. (2016). Dynamics of biomass partitioning, stem gene expression, cell wall biosynthesis, and sucrose accumulation during development of *Sorghum bicolor*. *Plant J*, n/a-n/a.
- Mclean, B.W., Bray, M.R., Boraston, A.B., Gilkes, N.R., Haynes, C.A., y Kilburn, D.G. (2000). Analysis of binding of the family 2a carbohydrate-binding module from *Cellulomonas fimi* xylanase 10A to cellulose: specificity and identification of functionally important amino acid residues. *Protein Eng* 13, 801-809.
- Meissner, K., Wassenberg, D., y Liebl, W. (2000). The thermostabilizing domain of the modular xylanase XynA of *Thermotoga maritima* represents a novel type of binding domain with affinity for soluble xylan and mixed-linkage  $\beta$ -1, 3/ $\beta$ -1, 4-glucan. *Molecular microbiology* 36, 898-912.
- Melis, A. (2013). Carbon partitioning in photosynthesis. *Curr Opin Chem Biol* 17, 453-456.

- Mello, B.L., y Polikarpov, I. (2014). Family 1 carbohydrate binding-modules enhance saccharification rates. *AMB Express* 4, 36.
- Mengiste, T., Revenkova, E., Bechtold, N., y Paszkowski, J. (1999). An SMC-like protein is required for efficient homologous recombination in Arabidopsis. *EMBO J* 18, 4505-4512.
- Meyer, E.A., Castellano, R.K., y Diederich, F. (2003). Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition. *Angew Chem Int Ed Engl* 42, 1210-1250.
- Minic, Z., Jamet, E., San-Clemente, H., Pelletier, S., Renou, J.P., Rihouey, C., Okinyo, D.P., Proux, C., Lerouge, P., y Jouanin, L. (2009). Transcriptomic analysis of Arabidopsis developing stems: a close-up on cell wall genes. *BMC Plant Biol* 9, 6.
- Minic, Z., y Jouanin, L. (2006). Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. *Plant Physiol Biochem* 44, 435-449.
- Mizuno, Y., Berenger, B., Moorhead, G.B., y Ng, K.K. (2007). Crystal structure of Arabidopsis PII reveals novel structural elements unique to plants. *Biochemistry* 46, 1477-1483.
- Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* 11, 266-277.
- Montanier, C. (2009). Evidence that family 35 carbohydrate binding modules display conserved specificity but divergent function. *Proc Natl Acad Sci USA* 106.
- Montanier, C., Van Bueren, A.L., Dumon, C., Flint, J.E., Correia, M.A., Prates, J.A., Firbank, S.J., Lewis, R.J., Grondin, G.G., Ghinet, M.G., Gloster, T.M., Herve, C., Knox, J.P., Talbot, B.G., Turkenburg, J.P., Kerovuo, J., Brzezinski, R., Fontes, C.M., Davies, G.J., Boraston, A.B., y Gilbert, H.J. (2009). Evidence that family 35 carbohydrate binding modules display conserved specificity but divergent function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3065-3070.
- Montanier, C.Y., Correia, M.A., Flint, J.E., Zhu, Y., Basle, A., Mckee, L.S., Prates, J.A., Polizzi, S.J., Coutinho, P.M., Lewis, R.J., Henrissat, B., Fontes, C.M., y Gilbert, H.J. (2011). A novel, noncatalytic carbohydrate-binding module displays specificity for galactose-containing polysaccharides through calcium-mediated oligomerization. *J Biol Chem* 286, 22499-22509.

- Mortimer, J.C., Faria-Blanc, N., Yu, X., Tryfona, T., Sorieul, M., Ng, Y.Z., Zhang, Z., Stott, K., Anders, N., y Dupree, P. (2015). An unusual xylan in Arabidopsis primary cell walls is synthesised by GUX3, IRX9L, IRX10L and IRX14. *Plant J* 83, 413-426.
- Moser, F., Irwin, D., Chen, S.L., y Wilson, D.B. (2008). Regulation and characterization of *Thermobifida fusca* carbohydrate-binding module proteins E7 and E8. *Biotechnol Bioeng* 100.
- Murzin, A.G., Lesk, A.M., y Chothia, C. (1992). beta-Trefoil fold. Patterns of structure and sequence in the Kunitz inhibitors interleukins-1 beta and 1 alpha and fibroblast growth factors. *J Mol Biol* 223, 531-543.
- Najmudin, S., Pinheiro, B.A., Prates, J.A., Gilbert, H.J., Romao, M.J., y Fontes, C.M. (2010). Putting an N-terminal end to the *Clostridium thermocellum* xylanase Xyn10B story: crystal structure of the CBM22-1-GH10 modules complexed with xylohexaose. *J Struct Biol* 172, 353-362.
- Nardi, C.F., Villarreal, N.M., Rossi, F.R., Martinez, S., Martinez, G.A., y Civello, P.M. (2015). Overexpression of the carbohydrate binding module of strawberry expansin2 in *Arabidopsis thaliana* modifies plant growth and cell wall metabolism. *Plant Mol Biol* 88, 101-117.
- Nei, M., y Kumar, S. (2000). Molecular Evolution and Phylogenetics.
- Nevoigt, E. (2008). Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 72, 379-412.
- Nguyen-Quoc, B. (2001). A role for 'futile cycles' involving invertase and sucrose synthase in sucrose metabolism of tomato fruit. *Journal of Experimental Botany* 52, 881-889.
- Notenboom, V., Boraston, A.B., Kilburn, D.G., y Rose, D.R. (2001). Crystal structures of the family 9 carbohydrate-binding module from *Thermotoga maritima* xylanase 10A in native and ligand-bound forms. *Biochemistry* 40, 6248-6256.
- Obembe, O.O., Jacobsen, E., Visser, R., y Vincken, J.P. (2007). Expression of an expansin carbohydrate-binding module affects xylem and phloem formation. *African journal of biotechnology* 6, 9.

- Oh, M.H., Sun, J., Oh, D.H., Zielinski, R.E., Clouse, S.D., y Huber, S.C. (2011). Enhancing Arabidopsis leaf growth by engineering the BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 receptor kinase. *Plant Physiol* 157, 120-131.
- Oliveira, C., Carvalho, V., Domingues, L., y Gama, F.M. (2015). Recombinant CBM-fusion technology - Applications overview. *Biotechnol Adv* 33, 358-369.
- Orzechowski, S. (2008). Starch metabolism in leaves. *Acta Biochim Pol* 55, 435-445.
- Palopoli, N., Busi, M.V., Fornasari, M.S., Gomez-Casati, D., Ugalde, R., y Parisi, G. (2006). Starch-synthase III family encodes a tandem of three starch-binding domains. *Proteins* 65, 27-31.
- Pauly, M. (2013). Hemicellulose biosynthesis. *Planta* 238.
- Peng, J., y Xu, J. (2011). RaptorX: exploiting structure information for protein alignment by statistical inference. *Proteins* 79 Suppl 10, 161-171.
- Peña, M.J., Ryden, P., Madson, M., Smith, A.C., y Carpita, N.C. (2004). The galactose residues of xyloglucan are essential to maintain mechanical strength of the primary cell walls in Arabidopsis during growth. *Plant Physiol* 134, 443-451.
- Perez-Iratxeta, C., y Andrade-Navarro, M.A. (2008). K2D2: estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *BMC Struct Biol* 8, 25.
- Persson, S., Paredez, A., Carroll, A., Palsdottir, H., Doblin, M., Poindexter, P., Khitrov, N., Auer, M., y Somerville, C.R. (2007). Genetic evidence for three unique components in primary cell-wall cellulose synthase complexes in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15566-15571.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., y Ferrin, T.E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25, 1605-1612.
- Pilling, E., y Hofte, H. (2003). Feedback from the wall. *Curr Opin Plant Biol* 6, 611-616.
- Pinto, R., Moreira, S., Mota, M., y Gama, M. (2004). Studies on the cellulose-binding domains adsorption to cellulose. *Langmuir* 20, 1409-1413.



- Plaxton, W.C. (1996). The Organization and Regulation of Plant Glycolysis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47, 185-214.
- Pollet, A., Sansen, S., Raedschelders, G., Gebruers, K., Rabijns, A., Delcour, J.A., y Courtin, C.M. (2009). Identification of structural determinants for inhibition strength and specificity of wheat xylanase inhibitors TAXI-IA and TAXI-IIA. *FEBS J.* 276, 3916-3927.
- Pozueta-Romero, J., Pozueta-Romero, D., Gonzalez, P., y Etxeberria, E. (2004). Activity of membrane-associated sucrose synthase is regulated by its phosphorylation status in cultured cells of sycamore (*Acer pseudoplatanus*). *Physiologia Plantarum* 122, 275-280.
- Quioco, F.A. (1988). "Molecular Features and Basic Understanding of Protein-Carbohydrate Interactions: The Arabinose-Binding Protein-Sugar Complex," in *Carbohydrate-Protein Interaction*, eds. A.E. Clarke & I.A. Wilson. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 135-148.
- Raghothama, S., Simpson, P.J., Szabo, L., Nagy, T., Gilbert, H.J., y Williamson, M.P. (2000). Solution structure of the CBM10 cellulose binding module from *Pseudomonas* xylanase A. *Biochemistry* 39, 978-984.
- Rahman, S., Bird, A., Regina, A., Li, Z., Philippe Ral, J., Mcmaugh, S., Topping, D., y Morell, M. (2007). Resistant starch in cereals: Exploiting genetic engineering and genetic variation. *Journal of Cereal Science* 46, 251-260.
- Rao, F.V., Houston, D.R., Boot, R.G., Aerts, J.M., Hodgkinson, M., Adams, D.J., Shiomi, K., Omura, S., y Van Aalten, D.M. (2005). Specificity and affinity of natural product cyclopentapeptide inhibitors against *A. fumigatus*, human, and bacterial chitinases. *Chem Biol* 12, 65-76.
- Rautengarten, C., Ebert, B., Moreno, I., Temple, H., Herter, T., Link, B., Donas-Cofre, D., Moreno, A., Saez-Aguayo, S., Blanco, F., Mortimer, J.C., Schultink, A., Reiter, W.D., Dupree, P., Pauly, M., Heazlewood, J.L., Scheller, H.V., y Orellana, A. (2014). The Golgi localized bifunctional UDP-rhamnose/UDP-galactose transporter family of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 11563-11568.

- Reese, E.T., Siu, R.G.H., y Levinson, H.S. (1950). The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *J Bacteriol* 59.
- Ricardo, C.P.P., y Ap Rees, T. (1970). Invertase activity during the development of carrot roots. *Phytochemistry* 9, 239-247.
- Rincon, M.T., Cepeljnik, T., Martin, J.C., Barak, Y., Lamed, R., Bayer, E.A., y Flint, H.J. (2007). A novel cell surface-anchored cellulose-binding protein encoded by the sca gene cluster of *Ruminococcus flavefaciens*. *J Bacteriol* 189, 4774-4783.
- Ringli, C. (2010). Monitoring the outside: cell wall-sensing mechanisms. *Plant Physiol* 153, 1445-1452.
- Ritchie, G.A. (1984). "Assesing seedling quality," in *Forest Nursery Manual: Production of Bareroot Seedlings*, eds. M.L. Duryea & T.D. Landis. The Hague/Boston/Lancaster: Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers), 243-259.
- Rodriguez-Sanoja, R., Ruiz, B., Guyot, J.P., y Sanchez, S. (2005). Starch-binding domain affects catalysis in two *Lactobacillus alpha*-amylases. *Appl Environ Microbiol* 71, 297-302.
- Rodriguez, R.E., Mecchia, M.A., Debernardi, J.M., Schommer, C., Weigel, D., y Palatnik, J.F. (2010). Control of cell proliferation in *Arabidopsis thaliana* by microRNA miR396. *Development* 137, 103-112.
- Rohila, J.S., Chen, M., Cerny, R., y Fromm, M.E. (2004). Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants. *Plant J* 38, 172-181.
- Rost, B. (1999). Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein Eng* 12, 85-94.
- Rymen, B., Coppens, F., Dhondt, S., Fiorani, F., y Beemster, G.T. (2010). Kinematic analysis of cell division and expansion. *Methods in molecular biology* 655, 203-227.
- Saeed, A.I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M., Sturn, A., Snuffin, M., Rezantsev, A., Popov, D., Ryltsov, A., Kostukovich, E., Borisovsky, I., Liu, Z., Vinsavich, A., Trush, V., y Quackenbush,

- J. (2003). TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 34, 374-378.
- Sainz-Polo, M.A., Gonzalez, B., Menendez, M., Pastor, F.I., y Sanz-Aparicio, J. (2015). Exploring Multimodularity in Plant Cell Wall Deconstruction: STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF Xyn10C CONTAINING THE CBM22-1-CBM22-2 TANDEM. *J Biol Chem* 290, 17116-17130.
- Sato, K., Suzuki, R., Nishikubo, N., Takenouchi, S., Ito, S., Nakano, Y., Nakaba, S., Sano, Y., Funada, R., Kajita, S., Kitano, H., y Katayama, Y. (2010). Isolation of a novel cell wall architecture mutant of rice with defective Arabidopsis COBL4 ortholog BC1 required for regulated deposition of secondary cell wall components. *Planta* 232, 257-270.
- Sayers, E.W., Barrett, T., Benson, D.A., Bryant, S.H., Canese, K., Chetvernin, V., Church, D.M., Dicuccio, M., Edgar, R., y Federhen, S. (2009). Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic acids research* 37, D5.
- Scheller, H.V., y Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annu Rev Plant Biol* 61, 263-289.
- Shen, H., Poovaiah, C.R., Ziebell, A., Tschapinski, T.J., Pattathil, S., Gjersing, E., Engle, N.L., Katahira, R., Pu, Y., Sykes, R., Chen, F., Ragauskas, A.J., Mielenz, J.R., Hahn, M.G., Davis, M., Stewart, C.N., Jr., y Dixon, R.A. (2013). Enhanced characteristics of genetically modified switchgrass (*Panicum virgatum* L.) for high biofuel production. *Biotechnol Biofuels* 6, 71.
- Shen, Y., Maupetit, J., Derreumaux, P., y Tuffery, P. (2014). Improved PEP-FOLD Approach for Peptide and Miniprotein Structure Prediction. *J Chem Theory Comput* 10, 4745-4758.
- Shoseyov, O., Shani, Z., y Levy, I. (2006). Carbohydrate binding modules: biochemical properties and novel applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 283-295.
- Shoseyov, O., Shani, Z., y Shpigel, E. (2001). Transgenic plants of altered morphology. *US Patent* 6.

- Simpson, H.D., y Barras, F. (1999). Functional analysis of the carbohydrate-binding domains of *Erwinia chrysanthemi* Cel5 (Endoglucanase Z) and an *Escherichia coli* putative chitinase. *J Bacteriol* 181, 4611-4616.
- Simsek, O., Sabanoglu, S., Con, A.H., Karasu, N., Akcelik, M., y Saris, P.E. (2013). Immobilization of nisin producer *Lactococcus lactis* strains to chitin with surface-displayed chitin-binding domain. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 4577-4587.
- Sinnokrot, M.O., Valeev, E.F., y Sherrill, C.D. (2002). Estimates of the ab initio limit for pi-pi interactions: the benzene dimer. *J Am Chem Soc* 124, 10887-10893.
- Smart, R.E. (1974). Rapid estimates of relative water content. *Plant Physiol* 53, 258-260.
- Smirnoff, N., y Wheeler, G.L. (2000). Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 35, 291-314.
- Smith, A.M., y Zeeman, S.C. (2006). Quantification of starch in plant tissues. *Nat Protoc* 1, 1342-1345.
- Southall, S.M., Simpson, P.J., Gilbert, H.J., Williamson, G., y Williamson, M.P. (1999). The starch-binding domain from glucoamylase disrupts the structure of starch. *FEBS Lett* 447, 58-60.
- Stork, J., Harris, D., Griffiths, J., Williams, B., Beisson, F., Li-Beisson, Y., Mendu, V., Haughn, G., y Debolt, S. (2010). CELLULOSE SYNTHASE9 serves a nonredundant role in secondary cell wall synthesis in *Arabidopsis* epidermal testa cells. *Plant Physiol* 153, 580-589.
- Streb, S., Egli, B., Eicke, S., y Zeeman, S.C. (2009). The debate on the pathway of starch synthesis: a closer look at low-starch mutants lacking plastidial phosphoglucomutase supports the chloroplast-localized pathway. *Plant Physiol* 151, 1769-1772.
- Streb, S., y Zeeman, S.C. (2012). Starch metabolism in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis book* 10, e0160.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., y Dubendorff, J.W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185, 60-89.

- Sturm, A., y Tang, G.Q. (1999). The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends Plant Sci* 4, 401-407.
- Sulpice, R., Pyl, E.T., Ishihara, H., Trenkamp, S., Steinfath, M., Witucka-Wall, H., Gibon, Y., Usadel, B., Poree, F., Piques, M.C., Von Korff, M., Steinhauser, M.C., Keurentjes, J.J., Guenther, M., Hoehne, M., Selbig, J., Fernie, A.R., Altmann, T., y Stitt, M. (2009). Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 10348-10353.
- Sulpice, R., Trenkamp, S., Steinfath, M., Usadel, B., Gibon, Y., Witucka-Wall, H., Pyl, E.T., Tschoep, H., Steinhauser, M.C., Guenther, M., Hoehne, M., Rohwer, J.M., Altmann, T., Fernie, A.R., y Stitt, M. (2010). Network analysis of enzyme activities and metabolite levels and their relationship to biomass in a large panel of Arabidopsis accessions. *Plant Cell* 22, 2872-2893.
- Suzuki, M., Kato, A., Nagata, N., y Komeda, Y. (2002). A xylanase, AtXyn1, is predominantly expressed in vascular bundles, and four putative xylanase genes were identified in the Arabidopsis thaliana genome. *Plant & cell physiology* 43, 759-767.
- Szydlowski, N., Ragel, P., Raynaud, S., Lucas, M.M., Roldan, I., Montero, M., Munoz, F.J., Ovecka, M., Bahaji, A., Planchot, V., Pozueta-Romero, J., D'hulst, C., y Merida, A. (2009). Starch granule initiation in Arabidopsis requires the presence of either class IV or class III starch synthases. *Plant Cell* 21, 2443-2457.
- Tedman-Jones, J.D., Lei, R., Jay, F., Fabro, G., Li, X., Reiter, W.D., Brearley, C., y Jones, J.D. (2008). Characterization of Arabidopsis mur3 mutations that result in constitutive activation of defence in petioles, but not leaves. *Plant J* 56, 691-703.
- Teeri, T.T., Penttila, M., Keranen, S., Nevalainen, H., y Knowles, J.K. (1992). Structure, function, and genetics of cellulases. *Biotechnology* 21, 417-445.
- Tetlow, I.J., Morell, M.K., y Emes, M.J. (2004). Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *J Exp Bot* 55, 2131-2145.
- Tharanathan, R.N. (2002). Food-derived carbohydrates--structural complexity and functional diversity. *Crit Rev Biotechnol* 22, 65-84.

- Thevenet, P., Shen, Y., Maupetit, J., Guyon, F., Derreumaux, P., y Tuffery, P. (2012). PEP-FOLD: an updated de novo structure prediction server for both linear and disulfide bonded cyclic peptides. *Nucleic Acids Res* 40, W288-293.
- Tilley, J.M.A., y Terry, R.A. (1963). A Two-Stage Technique for the in Vitro Digestion of Forage Crops. *Grass and Forage Science* 18, 104-111.
- Tomme, P., Boraston, A., Mclean, B., Kormos, J., Creagh, A.L., Sturch, K., Gilkes, N.R., Haynes, C.A., Warren, R.A., y Kilburn, D.G. (1998). Characterization and affinity applications of cellulose-binding domains. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications* 715, 283-296.
- Tormo, J., Lamed, R., Chirino, A.J., Morag, E., Bayer, E.A., Shoham, Y., y Steitz, T.A. (1996). Crystal structure of a bacterial family-III cellulose-binding domain: a general mechanism for attachment to cellulose. *EMBO J* 15, 5739-5751.
- Trott, O., y Olson, A.J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 31, 455-461.
- Turner, S.R., y Somerville, C.R. (1997). Collapsed xylem phenotype of Arabidopsis identifies mutants deficient in cellulose deposition in the secondary cell wall. *Plant Cell* 9, 689-701.
- Vaaje-Kolstad, G., Horn, S.J., y Van Aalten, D.M.F. (2005). The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation. *Journal of Biological ...*
- Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Horn, S.J., Liu, Z.L., Zhai, H., Sørli, M., y Eijsink, V.G.H. (2010). An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. *Science* 330.
- Valdez, H.A., Busi, M.V., Wayllace, N.Z., Parisi, G., Ugalde, R.A., y Gomez-Casati, D.F. (2008). Role of the N-terminal starch-binding domains in the kinetic properties of starch synthase III from *Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry* 47, 3026-3032.

- Valdez, H.A., Peralta, D.A., Wayllace, N.Z., Grisolia, M.J., Gomez-Casati, D.F., y Busi, M.V. (2011). Preferential binding of SBD from *Arabidopsis thaliana* SSIII to polysaccharides: Study of amino acid residues involved. *Starch - Stärke* 63, 451-460.
- Van Aalten, D.M.F., Synstad, B., Brurberg, M.B., Hough, E., Riise, B.W., Eijssink, V.G.H., y Wierenga, R.K. (2000). Structure of a two-domain chitotriosidase from *Serratia marcescens* at 1.9-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 5842-5847.
- Van Bueren, A.L., Higgins, M., Wang, D., Burke, R.D., y Boraston, A.B. (2007). Identification and structural basis of binding to host lung glycogen by streptococcal virulence factors. *Nat Struct Mol Biol* 14, 76-84.
- Van Tilbeurgh, H., Tomme, P., Claeysens, M., Bhikhabhai, R., y Pettersson, G. (1986). Limited proteolysis of the cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *FEBS Letters* 204, 223-227.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., y Boerjan, W. (2010). Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol* 153, 895-905.
- Venditto, I., Najmudin, S., Luis, A.S., Ferreira, L.M., Sakka, K., Knox, J.P., Gilbert, H.J., y Fontes, C.M. (2015). Family 46 Carbohydrate-binding Modules Contribute to the Enzymatic Hydrolysis of Xyloglucan and beta-1,3-1,4-Glucans through Distinct Mechanisms. *J Biol Chem* 290, 10572-10586.
- Vicente, A.R., Costa, M.L., Martínez, G.A., Chaves, A.R., y Civello, P.M. (2005). Effect of heat treatments on cell wall degradation and softening in strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology* 38, 213-222.
- Villar, R., Ruiz-Robledo, J., Quero, J.L., Poorter, ., Alladares, F., M, y Añón, T. (2004). "Tasas de crecimiento en especies leñosas: aspectos funcionales e implicaciones ecológicas," in *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante*, ed. F. Valladares. EGRAF, S. A.), 191-227.
- Vivian, J.T., y Callis, P.R. (2001). Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophys J* 80, 2093-2109.

- Von Schaewen, A., Rips, S., Jeong, I.S., y Koiwa, H. (2015). Arabidopsis thaliana KORRIGAN1 protein: N-glycan modification, localization, and function in cellulose biosynthesis and osmotic stress responses. *Plant Signal Behav* 10, e1024397.
- Voordeckers, K., Brown, C.A., y Vanneste, K. (2012). Reconstruction of ancestral metabolic enzymes reveals molecular mechanisms underlying evolutionary innovation through gene duplication. *PLoS Biol.*
- Walker, J.A., Takasuka, T.E., Deng, K., Bianchetti, C.M., Udell, H.S., Prom, B.M., Kim, H., Adams, P.D., Northen, T.R., y Fox, B.G. (2015). Multifunctional cellulase catalysis targeted by fusion to different carbohydrate-binding modules. *Biotechnol Biofuels* 8, 220.
- Wang, L., Zhang, Y., y Gao, P. (2008). A novel function for the cellulose binding module of cellobiohydrolase I. *Sci China C Life Sci* 51, 620-629.
- Watanabe, Y., Meents, M.J., McDonnell, L.M., Barkwill, S., Sampathkumar, A., Cartwright, H.N., Demura, T., Ehrhardt, D.W., Samuels, A.L., y Mansfield, S.D. (2015). Visualization of cellulose synthases in Arabidopsis secondary cell walls. *Science* 350, 198-203.
- Wayllace, N.Z., Valdez, H.A., Meras, A., Ugalde, R.A., Busi, M.V., y Gomez-Casati, D.F. (2012). An enzyme-coupled continuous spectrophotometric assay for glycogen synthases. *Mol Biol Rep* 39, 585-591.
- Wayllace, N.Z., Valdez, H.A., Ugalde, R.A., Busi, M.V., y Gomez-Casati, D.F. (2010). The starch-binding capacity of the noncatalytic SBD2 region and the interaction between the N- and C-terminal domains are involved in the modulation of the activity of starch synthase III from Arabidopsis thaliana. *FEBS J* 277, 428-440.
- Weigel, D., y Glazebrook, J. (2002). *Arabidopsis: A Laboratory Manual*.
- Wiederschain, G.Y. (2009). Essentials of glycobiology. *Biochemistry (Moscow)* 74, 1056-1056.
- Wiese, A., Christ, M.M., Virnich, O., Schurr, U., y Walter, A. (2007). Spatio-temporal leaf growth patterns of Arabidopsis thaliana and evidence for sugar control of the diel leaf growth cycle. *New Phytol* 174, 752-761.



- Wolf, S., Hematy, K., y Hofte, H. (2012). Growth control and cell wall signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* 63, 381-407.
- Wrobel-Kwiatkowska, M., Starzycki, M., Zebrowski, J., Oszmianski, J., y Szopa, J. (2007). Lignin deficiency in transgenic flax resulted in plants with improved mechanical properties. *J Biotechnol* 128, 919-934.
- Xiao, Z., Gao, P., Qu, Y.B., y Wang, T. (2001). Cellulose-binding domain of endoglucanase III from *Trichoderma reesei* disrupting the structure of cellulose. *Biotechnology Letters* 23, 711-715.
- Xie, H., Gilbert, H.J., Charnock, S.J., Davies, G.J., Williamson, M.P., Simpson, P.J., Raghothama, S., Fontes, C.M., Dias, F.M., Ferreira, L.M., y Bolam, D.N. (2001). *Clostridium thermocellum* Xyn10B carbohydrate-binding module 22-2: the role of conserved amino acids in ligand binding. *Biochemistry* 40, 9167-9176.
- Xu, D., y Zhang, Y. (2011). Improving the physical realism and structural accuracy of protein models by a two-step atomic-level energy minimization. *Biophys J* 101, 2525-2534.
- Yamamori, M., y Quynh, N.T. (2000). Differential effects of Wx-A1, -B1 and -D1 protein deficiencies on apparent amylose content and starch pasting properties in common wheat. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 100, 32-38.
- Yaniv, O. (2014). Fine-structural variance of family 3 carbohydrate-binding modules as extracellular biomass-sensing components of *Clostridium thermocellum* anti-sigmaI factors. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 70.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., y Madden, T.L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics* 13, 134.
- Yoo, S.D., Cho, Y.H., y Sheen, J. (2007). *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc* 2, 1565-1572.
- York, W.S., Darvill, A.G., Mcneil, M., Stevenson, T.T., y Albersheim, P. (1986). "Isolation and characterization of plant cell walls and cell wall components," in *Methods in Enzymology*. Academic Press), 3-40.

- Zabotina, O.A. (2012). Xyloglucan and its biosynthesis. *Front Plant Sci* 3, 134.
- Zeeman, S.C., Smith, S.M., y Smith, A.M. (2007). The diurnal metabolism of leaf starch. *Biochem J* 401, 13-28.
- Zhang, X., Myers, A.M., y James, M.G. (2005). Mutations affecting starch synthase III in *Arabidopsis* alter leaf starch structure and increase the rate of starch synthesis. *Plant Physiol* 138, 663-674.
- Zhang, X., Szydlowski, N., Delvalle, D., D'hulst, C., James, M.G., y Myers, A.M. (2008). Overlapping functions of the starch synthases SSII and SSIII in amylopectin biosynthesis in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol* 8, 96.
- Zhang, Y., Chen, S., He, M., Wu, J., Chen, J., y Wang, Q. (2011). Effects of *Thermobifida fusca* cutinase-carbohydrate-binding module fusion proteins on cotton bioscouring. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 16, 645-653.
- Zmasek, C.M., y Eddy, S.R. (2001). A simple algorithm to infer gene duplication and speciation events on a gene tree. *Bioinformatics* 17, 821-828.

# ANEXO I

---

Nombre	Gen	Locus
Celulosa sintasa 1	<i>CESA1</i>	AT4G32410
Celulosa sintasa 3	<i>CESA3</i>	AT5G05170
Celulosa sintasa 4	<i>CESA4</i>	AT5G44030
Celulosa sintasa 5	<i>CESA5</i>	AT5G09870
Celulosa sintasa 6	<i>CESA6</i>	AT5G64740
Celulosa sintasa 7 (IRX3)	<i>CESA7</i>	AT5G17420
Celulosa sintasa 8	<i>CESA8</i>	AT4G18780
Cinamil alcohol deshidrogenasa 6 (AtCAD6) (CAD5)	<i>CAD6</i>	AT4G34230
Expansina 2	<i>ATEXPA2</i>	AT5G05290
Expansina 8	<i>ATEXPA8</i>	AT2G40610
Expansina 9	<i>ATEXPA9</i>	AT5G02260
Expansina 10	<i>ATEXPA10</i>	AT1G26770
Expansina 11	<i>ATEXPA11</i>	AT1G20190
Celulasa	<i>ATGH9C2</i>	AT1G64390
Xiloglucano endotransglucosilasa	<i>XETG</i>	AT2G14620
Xilanasas	<i>RXF12 (ATXYN1)</i>	AT1G58370
Xilosil-Transferasa 1	<i>XT1</i>	AT3G62720
UDP-Xilosil-Transferasa 2	<i>XT2</i>	AT4G02500
Glucosil-Transferasa	<i>MUR3</i>	AT2G20370
UDP-xilosiltransferasa	<i>XGD1</i>	AT5G33290
Glucosiltransferasa	<i>AT3G42180</i>	AT3G42180
Korrigán-Celulasa	<i>KOR1 (ATGH9A1)</i>	AT5G49720
Receptor quinasa regulado por Brasinoesteroides	<i>THE1</i>	AT5G54380.1
Receptor quinasa rico en repeticiones de Leu	<i>FEI1</i>	AT1G31420
Receptor quinasa rico en repeticiones de Leu	<i>FEI2</i>	AT2G35620
Proteína de membrana anclada a GPI	<i>COBRA</i>	AT5G60920
Quinasa asociada a pared 1	<i>WAK1</i>	AT1G21250.1
Quinasa asociada a pared 2	<i>WAK2</i>	AT1G21270
Quinasa tipo receptor (RLK)	<i>ANX1</i>	AT3G04690
Quinasa tipo receptor (RLK)	<i>ANX2</i>	AT5G28680
Receptor quinasa tipo extensina rico en Prolina 4	<i>PERK4</i>	AT2G18470
O-metiltransferasa del ácido cafeico	<i>ATOMT1</i>	AT5G54160
4-Cumarato-CoA Ligasa 1	<i>4CL-1</i>	AT1G51680.1
4-Cumarato-CoA Ligasa 2	<i>4CL-2</i>	AT3G21240
Cinamoil CoA reductasa 1	<i>CCR1</i>	AT1G15950.1
Cinamoil CoA reductasa 2	<i>CCR2</i>	AT1G80820.1
Caffeoil-CoA O-metiltransferasa (CCoAMT)	<i>CCOMT</i>	AT1G67980

**Tabla Anexo 1 Detalle de los genes involucrados en el metabolismo de la pared celular.**

Se detalla nombre de la enzima; y nombre y locus del gen.

Nombre	Gen	Locus
Almidón Sintasa unida a Granulo	<i>GBSSI</i>	AT1G32900
Almidón Sintasa I	<i>SSI</i>	AT5G24300
Almidón Sintasa II	<i>SSII</i>	AT3G01180
Almidón Sintasa III	<i>SSIII</i>	AT1G11720
Almidón Sintasa IV / V	<i>SSIV (SSV)</i>	AT4G18240
Enzima ramificadora de almidón (I)	<i>SBE 2.1 (SBE3)</i>	AT2G36390
Enzima ramificadora de almidón (II)	<i>SBE 2.2 (SBE2)</i>	AT5G03650

$\alpha$ -Amilasa	<i>AMY2</i>	AT1G76130
$\alpha$ -Amilasa (plastídica)	<i>AMY3</i>	AT1G69830
$\alpha$ -Glucano transferasa	<i>DPE1</i>	AT5G64860
$\alpha$ -Glucano transferasa	<i>DPE2</i>	AT2G40840
$\alpha$ -Glucano Fosforilasa (citosólica) (Almidón Fosforilasa)	<i>PHS2</i>	AT3G46970
Glucano/H <sub>2</sub> O Diquinasa	<i>GWD (SEX1)</i>	AT1G10760
Fosfoglucono/H <sub>2</sub> O Diquinasa	<i>PWD (GWD3)</i>	AT5G26570
ADPGlcPPasa small subunit 1	<i>ApS1</i>	AT5G48300
ADPGlcPPasa large subunit 1	<i>ApL1</i>	AT5G19220
UDPGlcPPasa	<i>UGP</i>	AT3G03250
Fosfoglucomutasa	<i>PGM</i>	AT5G51820
Proteína de iniciación de síntesis de almidón (Glucogenin-like) 1	<i>PGSIP1</i>	AT3G18660.1
Fosfatasa turn over (Hojas)	<i>LSF1</i>	AT3G01510
Protein - Tirosin, serin, treonina fosfatasa / Quinasa	<i>SEX4</i>	AT3G52180.1
Fosfatasa cloroplástica	<i>AT3G10940</i>	AT3G10940
Proteína de unión a almidón (cloroplástica)	<i>PII</i>	AT5G39790
Isoamilasas (debranching enzymes)	<i>DBE1</i>	AT1G03310.2
Pullulanasa (debranching enzymes)	<i>ATLDA</i>	AT5G04360
Hexoquinasa 1	<i>HXK1</i>	AT4G29130
Hexoquinasa 2	<i>HXK2</i>	AT2G19860
Fosfoglucoisomerasa C	<i>PGIC</i>	AT5G42740
Fosfoglucoisomerasa 1	<i>PGI1</i>	AT4G24620
Sacarosa Sintasa 1	<i>SUS1</i>	AT5G20830.1
Sacarosa Sintasa 3	<i>SUS3</i>	AT4G02280
Sacarosa Sintasa 5	<i>SUS5</i>	AT5G37180
Sacarosa Fosfato Sintasa 3F	<i>ATSPS3F, SPS3</i>	AT1G04920
Impaired Sucrose Induction 1	<i>ISI1</i>	AT4G27750
Invertasa Vacuolar	<i>VAC-INV</i>	AT1G12240
Invertasa 2 (O-glucosil hidrolasa)	<i>AtcwINV2</i>	AT3G52600.1

**Tabla Anexo 2 Detalle de los genes involucrados en el metabolismo de almidón y sacarosa.**

Se detalla nombre de la enzima; y nombre y locus del gen.

## ANEXO II

---

Script de Perl utilizado para la obtención de las secuencias primarias de los CBM de todas las familias CAZy.

```
#!/usr/bin/perl -w -s
#A partir de la página web en formato HTML (guardadas) y convertidas a csv (con Excel)
#abrir archivo CSV; Split por , (coma); imprimir a archivo el tag UNIPROT
my $file = "cazysimple2.csv";
open (GB, ">GB.txt");
open (Uni, ">Uni.txt");
open(Input, $file) || die "no se puede abrir";
while (my $line = <Input>){
    chomp $line;
    my @col = split /\t/, $line;
    print GB $col[3] . "\n";
    print Uni $col[4] . "\n";
}
#limpio los espacios vacíos y la palabra Uniprot
open (limpio, ">unilimpio.txt");
my $var=`grep -v Uniprot Uni.txt |grep '.'`;
print limpio $var;

#limpio los espacios vacíos y la palabra GenBank
open (limpio, ">GBlimpio.txt");
my $var=`grep -v GenBank GB.txt |grep '.'`;
print limpio $var;

#formatea el output pfam enviado por email
#cuando existan más de dos espacios vacíos lo reemplazo por tab
my $file = "CDsearch_allCBM.txt";
open (tab, ">CD_tab.txt");
open(pfam, $file) || die "no se puede abrir";
while (my $line = <pfam>){
    chomp $line;
    $line =~ s/\s+/\t/g;
    #print $line . "\n";
    print tab $line . "\n";
}

#me quedo con las primeras 3 columnas (ID, inicio del dominio, final del dominio) (el loop de
arriba cortaba antes-por eso no lo uso)
open (cbm, ">coor.txt");
my $var=`cut -f6-7 CD_tab.txt`;
print cbm $var;
```

#Para utilizar subtring necesito la coordenada de inicio, y la longitud del corte. Entonces resto column 2 menos la 1 y la imprimo al final del archivo

```
my $file = "coord.txt";
open (resto, ">rest.txt");
open(Input, $file) || die "no se puede abrir";
while (my $line = <Input>){
    chomp $line;
    my @col = split (/ /, $line);
    $dif =($col[1]-$col[0]);
    $tot=$line."    ".$dif;
    print resto ($tot) . "\n";
}
```

#debido a que no todas las proteínas indicadas en CAZy presentan CBM para pfam, necesito generar otro archivo fasta solo con los ID retornados por Uniprot

```
my $file = "CD_tab.txt";
open(Uni2, $file) || die "no se puede abrir";
open (Uni, ">Uninuevo.txt");
while ($line = <Uni2>){
    chomp $line;
    my @col = split (/ /, $line);
    print Uni $col[1] . "\n";
}
```

#el archivo Fasta enviado por Uniprot debe ser leído línea a línea, para eso utilizo Bioperl y genero un archivo con las secuencias únicamente

```
use Bio::SeqIO;
open(spl, ">fastaseq2.txt");
my $seqio = Bio::SeqIO->new(-file => "RetrvCD.fasta", '-format' => 'Fasta');
while(my $seq = $seqio->next_seq) {
    my $string = $seq->seq;
    print spl $string . "\n";
}
```

#debido a que tengo que repetir las secuencias del FASTA según las veces que aparezcan en pfam (1 proteína tiene más de 1 dominio CBM), entonces debo determinar cuántas veces se repiten en el archivo pfam

```
open (cbm, ">orden.txt");
my $var=`uniq -c Uninuevo.txt`;
print cbm $var;
```

#copia columna 1 y cuenta cuantas veces se repite un nombre. Genera archivo a partir de la salida

```
open (tab, ">orden2.txt");
my $var1=`sed 's/ * /t/g' 'orden.txt'`;
print tab $var1;
```



```

#obtengo solo las veces que se repite una secuencia
my $file = "orden2.txt";
open (repe, ">repe.txt");
open(orde, $file) || die "no se puede abrir";
while ($line = <orde>){
    my @col = split (/t/, $line);
    print repe $col[1] . "\n";
}

#pegar archivos línea a línea
open (rep, ">fastarepe.txt");
my $var=`paste fastaseq2.txt repe.txt`;
print rep $var;

#abrir archivo fasta repe, leerlo línea a línea, e imprimir col[0] tantas como diga col[1].
my $file = "fastarepe.txt";
open (multi, ">multi.txt");
open(Input, $file) || die "no se puede abrir";
while (my $line = <Input>){
    chomp $line;
    my @col = split (/s/, $line);
    print multi ($col[0]."\n" x $col[1]);
}

#pegar archivos línea a línea
open (sum, ">suma.txt");
my $var=`paste rest.txt      multi.txt`;
print sum $var;

#debido a que no todas las proteínas indicadas en CAZy presentan CBM para pfam, necesito
generar otro archivo fasta solo con los ID retornados por Uniprot
my $file = "CD_tab.txt";
open(Uni2, $file) || die "no se puede abrir";
open (Uni, ">CD_tabfinal.txt");
while ($line = <Uni2>){
    chomp $line;
    my @col = split (/      /, $line);
    print Uni $col[3] . "\t" . $col[4] . "\t" . $col[5] . "\t" . $col[6] . "\t" . $col[7] . "\t" .
$col[8] . "\t" . $col[9] . "\t" . $col[10] . "\n";
}

#!/usr/bin/perl -w
my $file = "suma.txt";
open (final, ">final.txt");
open(Input, $file) || die "no se puede abrir";
while (my $line = <Input>){
    chomp $line;
    my @col = split (/      /, $line);

```

```
    print final substr ($col[3], $col[0], $col[2]) . "\n";  
}
```

```
#pegar archivos línea a línea  
open (sum, ">Dominios.txt");  
my $var=`paste Uninuevo.txt CD_tabfinal.txt final.txt`;  
print sum $var;
```